

---

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**Elizabeth Sousa da Cunha**

**ESTÍMULO DA MELANOGÊNESE E TRATAMENTO COM  
OXIGÊNIO MOLECULAR SINGLETE: EFEITOS EM CÉLULAS  
MELAN-A E B16-F10**

CURITIBA

2012

---

**Elizabeth Sousa da Cunha**

**ESTÍMULO DA MELANOGÊNESE E TRATAMENTO COM  
OXIGÊNIO MOLECULAR SINGLETE: EFEITOS EM CÉLULAS  
MELAN-A E B16-F10**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências: Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutor em Ciências - Bioquímica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Glaucia Regina Martinez

CURITIBA  
2012

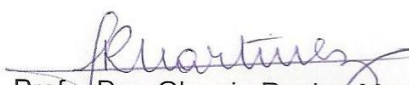
## TERMO DE APROVAÇÃO

ELIZABETH SOUSA DA CUNHA

### ESTÍMULO DA MELANOGÊNESE E TRATAMENTO COM OXIGÊNIO MOLECULAR SINGLETE: EFEITOS EM CÉLULAS MELAN-A E B16-F10

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Ciências (Bioquímica) no Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

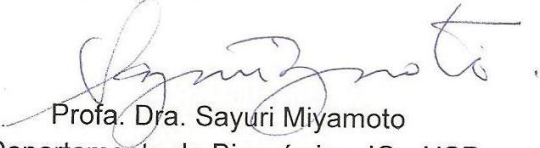
Orientadora:



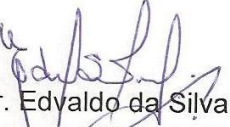
Profa. Dra. Glaucia Regina Martinez  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular



Prof. Dr. Jose Cesar Rosa  
Departamento de Biologia Celular Molecular e Bioagentes  
Patogênicos, USP – Ribeirão Preto



Profa. Dra. Sayuri Miyamoto  
Departamento de Bioquímica, IQ - USP



Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade  
Departamento de Biologia Celular, UFPR



Profa. Dra. Silvia Maria Suter Correia Cadena  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR.

---

*Dedico este trabalho aos meus pais, que são a razão de eu ter chegado até aqui... Muito obrigado!*

---

## **Agradecimentos**

À Deus, que me deu forças para chegar até aqui!

Aos meus pais, Maria e José, que sempre me apoiaram, aconselharam, e deram todo o suporte para essa conquista. Obrigada pela compreensão nos momentos de ausência e pela ajuda em cuidar da Gabi nos momentos que eu precisei, com todo o carinho.

Aos meus irmãos Renato, Patrícia e Beatriz e à minha sobrinha Bruna e meus sobrinhos Felipe e Vitor por compartilharem comigo mais um etapa.

Ao meu marido Hugo, pelo apoio, paciência e ombro amigo nas horas difíceis, pelo carinho, confiança e incentivo. Muito obrigada por compartilhar comigo mais essa conquista.

À minha filhinha Gabriela, eu peço desculpas pela ausência e muitas vezes impaciência por conta das obrigações com o doutorado.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup> Glaucia Regina Martinez pela orientação, apoio e confiança no meu trabalho.

À minha amiga Andréia A. Suzukawa, pela amizade, discussões, sugestões, diversão e apoio em todas as horas. Obrigada por ser minha conselheira pessoal, amiga “ninja” que tem solução pra tudo e minha salvadora em muitos momentos. Obrigada por tudo!

À minha aluna de iniciação científica Rebeca Kawahara pelo empenho nas análises de Bioinformática desse trabalho, pela contribuição experimental e pela amizade.

À Amanda e Carol Valente pela amizade, apoio e reflexões da vida...

Ao Thiago Jacomasso pela amizade e pelo auxílio de informática, de biologia molecular e de assuntos afins!

Aos amigos Arquimedes e Danilo pelas discussões sobre colegiado, risadas, cervejas e momentos difíceis e divertidos!

Aos companheiros do Grupo de Oxidações Biológicas: Tatiane Herrerias, Glaucio, Mônica Kangussu, Hudson, Alex, Patti Peres, Eduardo Aliprandini, Carol Pelosi, Ju Kenski, Lyvia, Monique, Fernanda, Ju Amorim (IC), Ju Amorim (mestranda), Carol Lane, Gisele, Regina, Camila, Anna Paula. Obrigada pelos momentos de trabalho e amizade.

Aos colegas de outros laboratórios: Fábio, Geison, Daiane, Tuca, Carol Heyse, Maria Isabel, Vivian e Nessana pelo apoio técnico, momentos de trabalho e diversão.

Aos amigos do Laboratório de Biomembranas da Unicamp que me deram força e incentivo para continuar na Bioquímica.

---

Ao Grupo de Fixação de Nitrogênio por disponibilizar o uso de alguns equipamentos em seus laboratórios.

Aos Professores do Grupo de Oxidações Biológicas por todo apoio necessário.

Aos Profs. Leda Chubatsu, Jaime Paba e Luciano Huergo por ajuda em discussão de experimentos que contribuíram para o trabalho.

Ao Prof. Paolo Di Mascio pela gentil doação de DHPN usado neste trabalho.

À técnica do laboratório Franciane.

Às secretárias D. Marilza e Irene por todo o apoio burocrático e pela amizade.

Às minhas amigas enfermeiras, que, apesar da separação, sempre estiveram presentes.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação e professores do Departamento de Bioquímica da UFPR.

Às minhas amigas de Cubatão que, mesmo à distância, acompanharam a minha trajetória.

À minha segunda família Sônia, D. Maria, Leonardo e Leandro que mesmo à distância sempre torceram por mim.

Aos amigos da Igreja Batista Betesda de Pinhais que tanto oraram para que eu mantivesse a paz necessária no fim deste trabalho.

À todos que compartilharam e contribuíram na minha formação.

À CAPES, CNPq, Fundação Araucária, FINEP/CT-INFRA e INCT de Processos Redox em Biomedicina Redoxoma pelo suporte financeiro.

---

*“Se, a princípio, a idéia não é absurda, então não há esperança para ela”*

*Albert Einstein*

---

## RESUMO

O melanoma é um tumor de pele agressivo com uma incidência crescente nas últimas décadas e a radiação ultravioleta (UV) tem sido implicada na gênese desse tumor. Na pele há um pigmento (melanina) que pode agir como agente protetor ao diminuir os efeitos danosos da radiação UV. Porém, estudos mostram que a melanina tem um papel controverso e pode aumentar as lesões quando células com estímulo de melanogênese são expostas à radiação UVA (320-400 nm). Muitos dos efeitos da radiação UVA têm sido relacionados com a geração de oxigênio molecular singlete ( $^1\text{O}_2$ ), porém, um aumento na quantidade de melanina parece modificar a resposta observada nos tratamentos com maiores concentrações de  $^1\text{O}_2$ , oferecendo proteção em relação à morte celular. Essas observações apontam para uma alta complexidade da resposta celular frente à ação do  $^1\text{O}_2$  e produção da melanina. Dessa forma, com o objetivo de melhor entender os mecanismos desencadeados por essas duas condições, produção aumentada de melanina e exposição ao  $^1\text{O}_2$ , o presente estudo investigou efeitos celulares dessas duas condições em melanócitos (Melan-a) e células de melanoma murinos (B16-F10). O estímulo da melanogênese foi realizado com suplementação do meio de cultura com 0,4 mM de L-Tirosina e 10 mM de cloreto de amônio. Como o estímulo da melanogênese não ocorreu na Melan-a, os experimentos com produção da melanina foram realizados somente com B16-F10. Os resultados mostraram aumentos dos níveis de ROS após 15 h de estímulo, parada de proliferação com acúmulo de células na fase G1 do ciclo celular e aumento dos níveis de RNA mensageiro de p21. Além disso, o estímulo não induziu senescência celular e análises proteômicas e RT-qPCR mostraram alterações de proteínas relacionadas ao ciclo celular, ao estresse e ao metabolismo. Com base nesses dados e em experimentos confirmatórios, concluiu-se que essas células, após o estímulo da melanogênese, entram no estado de quiescência, que funciona como uma proteção contra os danos promovidos pela síntese de melanina. Para avaliar os efeitos do  $^1\text{O}_2$ , foi utilizada a sua geração por termólise do endoperóxido derivado do naftaleno (DHPNO<sub>2</sub>) a 37°C. As células foram tratadas por 2 h com 10 mM de DHPNO<sub>2</sub>. Os resultados mostraram menor viabilidade celular somente das células de melanoma B16-F10. Análises proteômicas mostraram que, na linhagem Melan-a, ocorrem alterações nas proteínas vimentina, ornitina aminotransferase e proibitina, que poderiam indicar que o  $^1\text{O}_2$  estaria induzindo uma transformação dos melanócitos, porém os baixos níveis das proteínas de choque térmico (HSPs) podem estar contribuindo para inibir esses efeitos, pois as HSPs são essenciais para a sobrevivência dos tumores. Quanto aos efeitos em B16-F10, houve diminuição dos níveis do complexo chaperona, HSP60 e HSP90, o que indica uma toxicidade do  $^1\text{O}_2$  nessas células, porém aparentemente essas alterações não estão associadas à morte celular, por causa do aumento de outras proteínas que podem estar envolvidas na recuperação das células. Os resultados dos supressores de tumor mostraram possíveis alterações no ciclo celular em ambas as linhagens, dado que não foi confirmado em análises de ciclo celular através de citometria de fluxo. Porém, características de senescência celular foram observadas após 36 horas do fim do tratamento com  $^1\text{O}_2$  em B16-F10. Esses dados mostram que o  $^1\text{O}_2$  age de forma diferente nas linhagens normal e tumoral, sendo que as informações adquiridas podem contribuir na busca de estratégias de prevenção e terapias mais eficazes.



---

Palavras-chaves: melanoma, melanogênese, oxigênio singlete, ROS, ciclo celular, proteoma

---

## ABSTRACT

Melanoma is an aggressive skin tumor with an increasing incidence in recent decades and the ultraviolet radiation (UV) has been implicated in the genesis of this tumor. In the skin, there is a pigment (melanin) that can act as a protective agent by reducing the harmful effects of UV radiation. However, studies show that melanin plays a controversial role and may increase injury when cells with stimulation of melanogenesis are exposed to UVA (320-400 nm). Many of the effects of UVA radiation have been associated with the generation of singlet molecular oxygen ( $^1\text{O}_2$ ), but an increase in the amount of melanin seems to modify the response observed in treatments with higher concentrations of  $^1\text{O}_2$ , providing protection against cell death. These observations point to a high complexity of the cellular response to the action of  $^1\text{O}_2$  and production of melanin. Thus, in order to better understand the mechanisms triggered by these two conditions, increased production of melanin and exposure to  $^1\text{O}_2$ , the present study investigated the cellular effects of these two conditions in melanocytes (Melan-a) and murine melanoma cells (B16-F10). For the melanogenesis stimulation, 0.4 mM L-Tyrosine and 10 mM ammonium chloride were added in the culture. As the stimulation of melanogenesis was not successful in Melan-a, the melanin production experiments were performed only with B16-F10. The results showed increase in ROS levels after 15 h of stimulation, arrest of cell proliferation with cell accumulation in G1 phase of cell cycle and increased levels of p21 mRNA. Furthermore, stimulation did not induce cellular senescence and proteomic and RT-qPCR analysis showed changes in proteins related to cell cycle, stress, and metabolism. Based on these data and confirmatory experiments, it was concluded that these cells enter into a quiescent state after stimulation of melanogenesis, which acts as a protection against damage promoted by the synthesis of melanin. To evaluate the effects of  $^1\text{O}_2$ , its generation was performed by thermolysis of the naphthalene endoperoxide (DHPNO<sub>2</sub>) at 37 °C. Cells were treated with 10 mM of DHPNO<sub>2</sub>. The results showed lower cell viability only for B16-F10. Proteomic analyzes showed that, in Melan-a, occurred alterations in the proteins vimentin, ornithine aminotransferase, and prohibitin, which could indicate that  $^1\text{O}_2$  was inducing transformation melanocytes, but low levels of heat shock proteins (HSPs) can contribute to inhibit those effects, as these proteins are essential for the survival of tumors. In B16-F10, there were decreased levels of the chaperone complex, HSP60 and HSP90, which indicates  $^1\text{O}_2$  toxicity in these cells, but apparently these alterations are not responsible for cell death, because of the increase in other proteins associate to the recovery of cells. The results of tumor suppressor showed possible alterations in cell cycle in both lineages, which was not confirmed by cell cycle analysis by flow cytometry. However, characteristics of cellular senescence were observed after 36 hours of the end of treatment in tumor cells. These data show that  $^1\text{O}_2$  acts differently in normal and tumor cells, and the information obtained contribute may contribute in the search of more effective strategies for prevention and therapies.

Keywords: melanoma, melanogenesis, singlet oxygen, ROS, cell cycle, proteomics

---

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	ETAPAS DA INICIAÇÃO E PROGRESSÃO DO MELANOMA	25
Figura 2	ESQUEMA DO FUNCIONAMENTO DA PDT	27
Figura 3	CASCATA DE REGULAÇÃO DA TEORIA DAS TRÊS ENZIMAS DA MELANOGENESE	33
Figura 4	ETAPAS DA BIOSÍNTESE DE MELANINA	34
Figura 5	CICLO CELULAR DOS MAMÍFEROS	37
Figura 6	ESTÍMULO DA MELANOGENESE APÓS 48 h	59
Figura 7	MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA MELANOGENESE POR MUDANÇAS NO PH	61
Figura 8	MECANISMO GERAL DA Sonda DCFH <sub>2</sub> -DA INTRACELULAR	62
Figura 9	PRODUÇÃO DE ROS DURANTE O ESTÍMULO DA MELANOGENESE POR 48 h	64
Figura 10	EFEITOS DO ESTÍMULO DA MELANOGENESE SOBRE A VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR	67
Figura 11	ALTERAÇÕES NO CICLO CELULAR APÓS ESTÍMULO DA MELANOGENESE	69
Figura 12	EFEITOS DO ESTÍMULO DA MELANOGENESE SOBRE O PROCESSO DE SENESCÊNCIA CELULAR	71
Figura 13	INDUÇÃO DE QUIESCÊNCIA CELULAR APÓS ESTÍMULO DA MELANOGENESE	73
Figura 14	ELETROFORESE BIDIMENSIONAL DE CÉLULAS B16-F10	77
Figura 15	DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE SPOTS DOS GÉIS REPRESENTADOS NA FIGURA 14	78
Figura 16	SPOTS DIFERENCIAIS DETECTADOS APÓS ANÁLISES DE ELETROFORESE BIDIMENSIONAL	78
Figura 17	EFEITOS DO ESTÍMULO DA MELANOGENESE SOBRE OS NÍVEIS DE mRNA E NA ATIVIDADE DA LACTATO DESIDROGENASE	91

---

Figura 18	VIABILIDADE CELULAR APÓS TRATAMENTO COM DHPNO <sub>2</sub>	93
Figura 19	ELETROFORESE BIDIMENSIONAL DA LINHAGEM MELAN-A APÓS TRATAMENTO COM DHPNO <sub>2</sub>	97
Figura 20	DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE SPOTS DOS GÉIS REPRESENTADOS NA FIGURA 19A E B	98
Figura 21	ELETROFORESE BIDIMENSIONAL DA LINHAGEM B16-F10 APÓS TRATAMENTO COM DHPNO <sub>2</sub>	103
Figura 22	DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE SPOTS DOS GÉIS REPRESENTADOS NA FIGURA 21A E B	104
Figura 23	RT-QPCR APÓS TRATAMENTO COM DHPNO <sub>2</sub>	108
Figura 24	EFEITOS DO DHPNO <sub>2</sub> NA EXPRESSÃO DE SUPRESSORES DE TUMOR	112
Figura 25	CICLO CELULAR APÓS TRATAMENTO COM DHPNO <sub>2</sub> DA LINHAGEM B16-F10	114
Figura 26	EFEITOS DO TRATAMENTO COM DHPNO <sub>2</sub> SOBRE O PROCESSO DE SENESCÊNCIA CELULAR	116

---

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA A REAÇÃO DE RT-QPCR	54
Tabela 2	PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS - MALDI-TOF APÓS ESTÍMULO DA MELANOGENESE	84
Tabela 3	PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS - MALDI-TOF NA LINHAGEM MELAN-A APÓS TRATAMENTO COM DHPNO <sub>2</sub> .	100
Tabela 4	PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS - MALDI-TOF NA LINHAGEM B16-F10 APÓS TRATAMENTO COM DHPNO <sub>2</sub> .	105

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$^1\text{O}_2$  – oxigênio molecular singlete

2-DE – eletroforese bidimensional

6BH<sub>4</sub> - tetrahidrobiopterina

AMP – adenosina 3',5'-monofosfato

AP-1 – *activator protein 1*

ATP – adenosina trifosfato

CAT – catalase

CCNU – 1-(2-cloroetil)-3-ciclohexil-1-nitrosuréia

CDK – ciclina dependente de kinase

cDNA – DNA complementar

CHAPS – 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamônio]-1-propanosulfonato

CHCA – ácido  $\alpha$ -Ciano-4-hidroxicinâmico

CT – ciclo *threshold*

DCFH<sub>2</sub>-DA – 2',7'-dichlorofluorescein diacetate

DHICA - ácido 5,6-dihidroxiindole-2-carboxílico

DHPN – N, N'-di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanamida

DHPNO<sub>2</sub> – endoperóxido de N, N'-di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)

dipropanamida

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTPs – deoxinucleotídeo trifosfatos

DTIC – 5-(3, 3-dimetiltrizene-1-il)-imidazol-4-carboxamida

DTT – Ditiotreitól

---

E2F – fator de transcrição

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EF2 – fator de alongamento 2

ESI – Eletrospray

FACS – *Fluorescence-activated cell sorting*

G1-pm – fase G1 pós-mitótica

G1-ps – fase G1 pré-fase S

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GPX – glutathione peroxidase

GRP – proteína regulada por glucose

GRP78 – proteína regulada por glucose 78 KDa

GSH – glutathione reduzida

GSPs – Proantocianidinas

HBSS – Solução Salina balanceada de Hanks

HEPES – (4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfônico

HPRT - hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase

HSE – elementos de choque térmico

HSF-1 – fator de transcrição de proteína de choque térmico 1

HSP60 – proteína de choque térmico 60 KDa

HSP70 – proteínas de choque térmico 70KDa

HSP90 – proteína de choque térmico 90 kDa

HSPA8 – proteína de choque térmico 70 KDa 8

Hspd1 – proteína de choque térmico 60 KDa 1

IEF – Focalização Isoelétrica

---

IPG - Gradiente de pH imobilizado

JNK – proteína envolvida na sinalização de apoptose

LAT1 – *large neutral amino acid transporter*

LDH – lactate desidrogenase

L-DOPA – L-3,4-dihidroxifenilalanina

MACF-1 – fator de *crosslinking* de microtúbulos de actina 1

MALDI-TOF – *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight – Mass Spectrometry*

MMP-1 – metaloproteinase 1

MnSOD – superóxido dismutase

MPB – 2-mercapto-1-(-4-piridetil) benzimidazol

mRNA – RNA mensageiro

MSDB – *Minnesota Stocks, Debentures and Bonds*

MTT – brometo de 3-metil [4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5difeniltetrazólio

NADH – nicotinamida adenina dinucleótido hidreto

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NQO1 – quinona oxidoreductase 1

OAT – ornitina aminotransferase

PAH – atividade de fenilalanina hidroxilase

PBS – Solução Salina Tamponada

PDIA3 – proteína dissulfeto isomerase A3

PDT – terapia fotodinâmica

PIG3 – *p53-inducible gene 3*

PKM2 – piruvato kinase isoenzima M2



---

PLK1 – polo-like kinase 1

PMA – Forbol 12-miristato 13-acetato

PMF – *peptide mass fingerprint*

PMSF – Fenilmetanosulfonilfluorídeo

pRb – proteína de retinoblastoma

PS – fotossensibilizador

PUMA – *p53 upregulated modulator of apoptosis*

RACK-1 – receptor de proteínas kinase C ativado

RGP- fase de crescimento radial

RNA – ácido ribonucleico

ROS – espécies reativas de oxigênio

RT-qPCR – *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS - PAGE – Poliacrilamida gel de eletroforese

SFB – soro fetal bovino

SOD – superóxido dismutase

TBE – tampão Tris/borato/EDTA

TEMED – Tetrametilenodiamina

TFA – ácido trifluoroacético

THI – tirosina hidroxilase isoforma 1

TRP-1 – DHICA oxidase

TRP-2 – dopacromo tautomerase

UV – radiação ultravioleta

VGP – fase de crescimento vertical

---

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>21</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>24</b>
2.1. MELANOMA	24
2.2. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	28
2.3. OXIGÊNIO MOLECULAR SINGLETE	29
2.4. MELANINA	31
2.5. CICLO CELULAR	36
2.5.1. Ciclinas dependente de quinase	37
2.6. SENESCÊNCIA X QUIESCÊNCIA	39
<b>3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b>	<b>42</b>
<b>4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL</b>	<b>43</b>
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>45</b>
5.1. CULTIVO DE CÉLULAS	45
5.1.1. Esterilização de Materiais	45
5.1.2. Soluções Tampão e Meios de Cultura	45
5.1.3. Cultura de células	46
5.2. ESTÍMULO DA MELANOGÊNESE E MEDIDA DA PRODUÇÃO DE MELANINA	47
5.3. SÍNTESE DE DHPNO <sub>2</sub>	47
5.4. TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM DHPNO <sub>2</sub>	48
5.5. MEDIDA DA PRODUÇÃO DE ROS INTRACELULAR	48
5.6. TESTES DE VIABILIDADE CELULAR	49
5.6.1. Método de MTT	49
5.6.2. Método de Cristal Violeta	49
5.7. CURVAS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	50
5.8. ANÁLISE DE CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO	50
5.9. DETERMINAÇÃO DA SENESCÊNCIA ATRAVÉS DO TESTE DE BETA-GALACTOSIDASE	51

---

5.10. DETERMINAÇÃO DA QUIESCÊNCIA CELULAR ATRAVÉS DA FLUORESCÊNCIA DE <i>PYRONIN Y</i>	51
5.11. EXPERIMENTOS DE RT-qPCR	52
5.11.1. Extração de RNA	52
5.11.2. Síntese de cDNA	52
5.11.3. RT-qPCR	53
5.12. ANÁLISES PROTEÔMICAS	54
5.12.1. Lise celular e solubilização de proteínas	54
5.12.2. Eletroforese bidimensional (2-DE)	55
5.12.3. Análise por espectrometria de massas – MALDI-TOF	56
5.13. MEDIDA DA ATIVIDADE DA LACTATO DESIDROGENASE	56
5.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>58</b>
6.1. EFEITO DO ESTÍMULO DA MELANOGÊNESE EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16-F10 E MELANÓCITOS MELAN-A	58
6.1.1. Estímulo da melanogênese	58
6.1.2. Produção de ROS	62
6.1.3. Proliferação e viabilidade celular	64
6.1.4. Alterações do ciclo celular após estímulo da melanogênese	68
6.1.5. Efeitos do estímulo da melanogênese sobre o processo de Senescência Celular	69
6.1.6. Indução de Quiescência Celular após estímulo da melanogênese	71
6.1.7. Análises Proteômicas após estímulo da melanogênese	74
6.1.8. Efeitos do estímulo da melanogênese sobre os níveis de mRNA e na atividade da Lactato Desidrogenase	88
6.2. EFEITOS DO TRATAMENTO COM DHPNO <sub>2</sub> EM LINHAGENS DE MELANÓCITO (MELAN-A) E MELANOMA MURINO (B16-F10)	92
6.2.1. Síntese do endoperóxido	92
6.2.2. Efeito do tratamento com DHPNO <sub>2</sub> sobre a viabilidade celular	92
6.2.3. Análises proteômicas após tratamento com DHPNO <sub>2</sub> .	94
6.2.4. RT-qPCR após tratamento com DHPNO <sub>2</sub> .	107

---

6.2.5. Efeitos do tratamento com DHPNO <sub>2</sub> sobre a expressão de genes de supressores de tumor	111
6.2.6. Manutenção do ciclo celular após tratamento com DHPNO <sub>2</sub>	113
6.2.7. Efeitos do tratamento com DHPNO <sub>2</sub> sobre o processo de Senescência Celular	115
<b>7. DISCUSSÃO FINAL</b>	<b>117</b>
<b>8. CONCLUSÕES</b>	<b>121</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>122</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>141</b>

---

## 1. INTRODUÇÃO

O melanoma é um tumor de pele agressivo com uma incidência crescente nas últimas décadas. Estudos epidemiológicos revelam uma forte associação desta doença com a exposição ao sol, uma vez que a luz ultravioleta (UV) tem sido relacionada à gênese de diversas formas de câncer cutâneo (IVRY, OGLE e SHIM, 2006). Sabe-se que a luz UV promove o aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), portanto o papel das ROS na formação de tumores e na sua destruição tem sido estudado intensivamente (FRIED e ARBISER, 2008; PAN, HONG e REN, 2009).

A pele tem o pigmento melanina que pode agir como um agente protetor ao diminuir os efeitos danosos da luz UV. Isso se deve ao fato de que a melanina absorve radiação na região UV, mas outras propriedades também parecem contribuir para esse efeito, dentre estas sua habilidade em remover ROS ou inibir sua formação (MARESCA *et al.*, 2008). Por outro lado, estudos *in vitro* mostraram que a irradiação da melanina por luz UV pode gerar ROS como superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $\bullet OH$ ) (KORYTOWSKI *et al.*, 1987). Além disso, mesmo na ausência de irradiação, a melanina promove quebras no DNA e sua interação com essa biomolécula impede a ação de enzimas de reparo, por dificultar o acesso destas às lesões (SUZUKAWA *et al.*, 2012). Esses efeitos podem estar associados a um possível dano celular em condições de melanogênese em excesso.

A estrutura dos melanossomos é anormal em células de melanoma, o que pode facilitar a liberação de intermediários da síntese de melanina, incluindo radicais e semiquinonas (BOROVANSKÝ, 1991). Adicionalmente, a geração de  $H_2O_2$  na polimerização terminal da melanina foi detectada durante a auto-oxidação e oxidações dos precursores deste pigmento (NAPPI, 1996). Portanto, o processo melanogênico pode causar danos celulares devido à ação dos intermediários tóxicos gerados na síntese de melanina. De fato, um aumento das lesões oxidativas em bases do DNA foi observado em células de melanoma com a síntese de melanina estimulada e irradiação por UV (KVAM e TYRRELL, 1999).

O estímulo da produção de melanina é mediado por diferentes vias de sinalização que envolvem uma cadeia de reações enzimáticas e não enzimáticas. Além da

participação neste processo de enzimas essenciais, como a tirosinase, outros estudos apontam para o envolvimento de diferentes proteínas, como HSP70, associada com a supressão da produção de melanina em melanogênese induzida por UV em células B16 (HOSHINO *et al.*, 2010) e a proteína proibitina, que atua como um regulador da melanogênese em células Melan-a e B16-F10 (SNYDER *et al.*, 2005). Interessantemente, estudos por análises proteômica dos efeitos da inibição da melanogênese por ácido kójico em células de melanoma humano A375, mostraram alterações em proteínas de estresse, com diminuição no volume de HSP90 e HSP70 e da proteína de citoesqueleto vimentina e aumento do conteúdo de outras proteínas relacionadas à proliferação celular (NAWARAK *et al.*, 2008). Adicionalmente, o estímulo da melanogênese com ácido ursólico em células B16-F0 resultou em inibição da proliferação celular, mas também desencadeou um mecanismo de inibição da apoptose (PINON *et al.*, 2011). Esses dados sugerem que diversos fatores estão envolvidos no estímulo da melanogênese e contribuem para os efeitos celulares observados durante o processo de produção da melanina.

Além disso, estudos com melanócitos, cuja biossíntese de melanina foi induzida, evidenciaram um aumento nos danos ao DNA quando estas células foram expostas à radiação UVA (320-400 nm) (MARROT *et al.*, 1999). Também foi mostrado um aumento no número de quebras no DNA de células expostas à radiação UVA quando na presença de precursores solúveis de melanina no meio de cultura (KIPP e YOUNG, 1999). Kvam e Tyrell (1999) descreveram um aumento de lesões oxidativas em bases do DNA em células de melanoma irradiadas por UVA. Os autores demonstraram um nível de lesão duas vezes maior nas células que tiveram a síntese de melanina estimulada (KVAM e TYRRELL, 1999).

A radiação UVA produz oxigênio molecular singlete ( $^1\text{O}_2$ ) e outras ROS através da interação da radiação com fotosensibilizadores endógenos na pele (TYRRELL, 1994), sendo essa a possível explicação para os danos causados pela UVA. Essas espécies reativas geradas pela irradiação de células têm sido usadas como tratamento de células malignas, no processo chamado terapia fotodinâmica (PDT) (WEISHAUPT, GOMER e DOUGHERTY, 1976). O  $^1\text{O}_2$  pode gerar alterações proteicas e modificações pós-traducionais que desencadeiam mudanças em eventos celulares (MORGAN, DEAN e

---

DAVIES, 2004). Um dos problemas da PDT é o aparecimento de populações de células resistentes, que são as responsáveis por processos metastáticos e recidivas (PERONA e SANCHEZ-PEREZ, 2004).

Muitos estudos têm tentado definir o estado de diferenciação das células de melanoma que as tornam resistentes às drogas e terapias (CHEN *et al.*, 2009) e correlacioná-lo com outros parâmetros de malignidade. Alguns dados apontam para o envolvimento de alterações em expressão proteica (CEDROLA, 2004), sendo assim, a proteômica tem sido utilizada para a definição de alguns desses parâmetros.

Dessa forma, com o objetivo de melhor entender os mecanismos desencadeados pela produção aumentada de melanina e exposição ao  $^1\text{O}_2$ , o presente estudo investigou efeitos celulares dessas duas condições em melanócitos e células de melanoma murinos.

---

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. MELANOMA

O melanoma é um câncer com origem nos melanócitos, células especializadas em pigmentação encontradas predominantemente na pele e olhos (CHEN *et al.*, 2006). Os melanócitos originam-se na crista neural progenitora de alta mobilidade e migram para a pele durante o desenvolvimento embrionário. Na pele, localizam-se na membrana basal da epiderme e nos folículos capilares, e sua homeostase é regulada por queratinócitos epidérmicos (SLOMINSKI *et al.*, 2004).

Quando surge uma lesão característica denominada de Nevo atípico, este pode evoluir para uma malignidade derivada da crista neural, que é o melanoma, assumindo um crescimento radial ou superficial não invasivo, que, devido a alterações genéticas, adquire capacidade de se tornar invasivo, angiogênico e metastático, iniciando a recorrência, metástases distantes e morte (GOVINDARAJAN *et al.*, 2007).

Existem quatro tipos básicos de melanoma: melanoma disseminativo superficial, melanoma lentiginoso maligno, melanoma acrolentiginoso e melanoma nodular. Nos três primeiros tipos, o tumor cresce em primeira instância, superficialmente ao longo do tempo, onde o poder de cura por excisão cirúrgica é grande, depois se torna invasivo, penetrando com mais profundidade nos tecidos. O último tipo é a forma mais invasiva do melanoma, gerando metástases precoces (Skin Cancer Information, 2012).

O Melanoma maligno cutâneo atinge grupos de indivíduos diferentes, dependendo da sua etiologia. O melanoma acrolentiginoso tem ocorrência similar em diferentes tipos de pele e se desenvolve na região da palma das mãos e nas plantas dos pés. Essas regiões da pele acometidas pelo melanoma acrolentiginoso, contém uma epiderme espessa, o que dificultaria a penetração da radiação UV, de forma que sua etiologia ainda permanece em investigação. Em contraste, mais de 90% dos pacientes que possuem os demais tipos de melanoma possuem pele clara, o que estaria mais diretamente relacionado à radiação UV e a menor quantidade de melanina que filtraria essa radiação (REES, 2008).



São muitas as alterações genéticas relacionadas à incidência do câncer. A maioria destas alterações pode ser dividida em categorias de genes, segundo Benjamin e Ananthaswamy (2007): Proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes de reparo do DNA. Alterações em genes pertencentes a um ou mais destes grupos cooperam na ocorrência do tumor.

O melanoma pode se desenvolver pela formação de um nevo benigno que consiste numa população de clones de melanócitos com proliferação aberrante, gerando uma hiperplasia que não progride (MOOI e PEEPER, 2006). Porém, devido a mutações no DNA, o nevo exibe displasia e pode subsequentemente progredir a um estágio de espalhamento superficial (fase de crescimento radial – RGP) que é confinado na epiderme e têm baixo potencial invasivo. Finalmente, as células em RGP adquirem habilidade para invadir a derme (fase de crescimento vertical – VGP) e gerar metástase (MILLER e MIHM, 2006). Essas etapas estão ilustradas na figura 1.

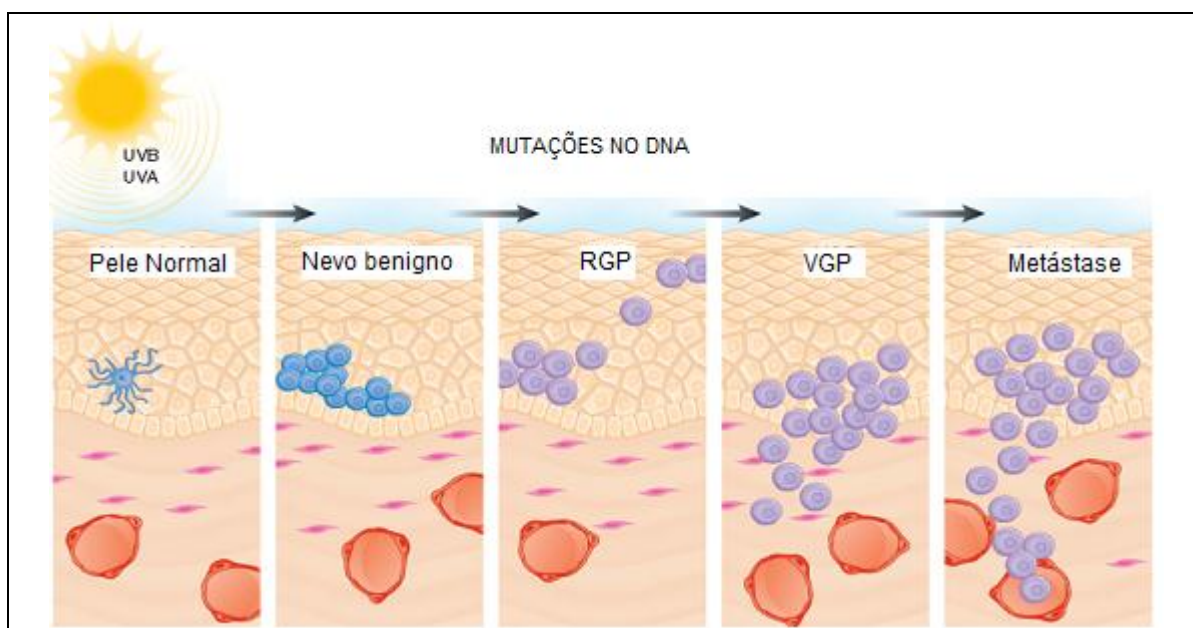


FIGURA 1 – ETAPAS DE INICIAÇÃO E PROGRESSÃO DO MELANOMA.

FONTE: modificado (ZAIDI, DAY e MERLINO, 2008).

Nota: A figura mostra um modelo proposto da iniciação e progressão do melanoma humano, no qual, o melanócito após irradiação UV pode sofrer mutações genéticas, e se transformar em células cada vez mais invasivas até chegar na fase metastática. RGP (“radial growth phase”) e VGP (“vertical growth phase”).

As formas de tratamento nos casos positivos de melanoma envolvem quimioterapia e cirurgia para excisão da área afetada, porém o melanoma maligno

metastático é uma das formas mais agressivas de câncer e muito resistente aos tratamentos baseados em drogas que agem sobre o DNA, microtúbulos e topoisomerasas, sendo assim é um tumor invariavelmente fatal (CHEN *et al.*, 2006).

Agentes alquilantes são as drogas mais freqüentemente usadas como tratamento. Os agentes de maior interesse são 5-(3, 3-dimetiltrizene-1-il)-imidazol-4-carboxamida (DTIC) e nitrosuréias como 1-(2-cloroetil)-3-ciclohexil-1-nitrosuréia (CCNU), mas a resposta à quimioterapia com essas drogas ainda é ineficaz. Apesar da alta atividade *in vivo*, a eficácia clínica das nitrosuréias é limitada por causa da toxicidade hematológica. Uma grande desvantagem do DTIC como agente quimioterápico são os efeitos colaterais, como náuseas, vômitos e cefaléia (NAJMAN, 2002; GADJEVA, DIMOV e GEORGIEVA, 2008).

Para um tratamento quimioterápico eficaz, seriam necessárias substâncias inócuas às células normais e que causassem uma sensibilização das células cancerosas aos medicamentos, favorecendo a terapia (SON *et al.*, 2005). Este procedimento reduziria as doses necessárias ou suas freqüências e conseqüentemente reduziria assim as reações adversas do tratamento convencional.

O mecanismo de ação comum entre alguns agentes quimioterápicos se dá através da geração de ROS, podendo ser a razão de tantos efeitos colaterais, como por exemplo, a cardiotoxicidade gerada por doxorubicina, nefrotoxicidade induzida por cisplatina e fibrose pulmonar induzida por bleomicina (MATÉS e SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 2000).

Existem também outros tipos de tratamentos para os melanomas, como a terapia fotodinâmica (PDT). A PDT envolve administração do fotossensibilizador de forma sistêmica ou local, seguido de irradiação da lesão-alvo com luz em um comprimento de onda adequado. Esse processo inicia uma reação fotoquímica que gera ROS na lesão, o que a diferencia dos demais tratamentos com elevação dos níveis de ROS sistêmicos. Os produtos citotóxicos gerados pela PDT desencadeiam uma cascata de eventos moleculares que geram uma resposta celular através de apoptose e/ou necrose com conseqüente destruição do tumor (CHEN *et al.*, 2008).

As principais vantagens da PDT sobre outros tratamentos convencionais incluem sua baixa toxicidade sistêmica, sua habilidade para destruir tumores, a possibilidade de

ser usada sozinha ou combinada a outros tratamentos, como quimioterapia, cirurgia, radioterapia ou imunoterapia. Por isso, PDT é considerada uma terapia promissora para diversos tipos de tumores, nas fases pré-malignas como displasias da mucosa ou carcinomas in-situ (HOPPER, 2000; CHEN *et al.*, 2008).

Embora os mecanismos precisos da PDT ainda não tenham sido completamente entendidos, geralmente é aceito que o  $^1\text{O}_2$  produzido pela reação do tipo II (figura 2) é o principal responsável pela morte celular (JUARRANZ *et al.*, 2008).

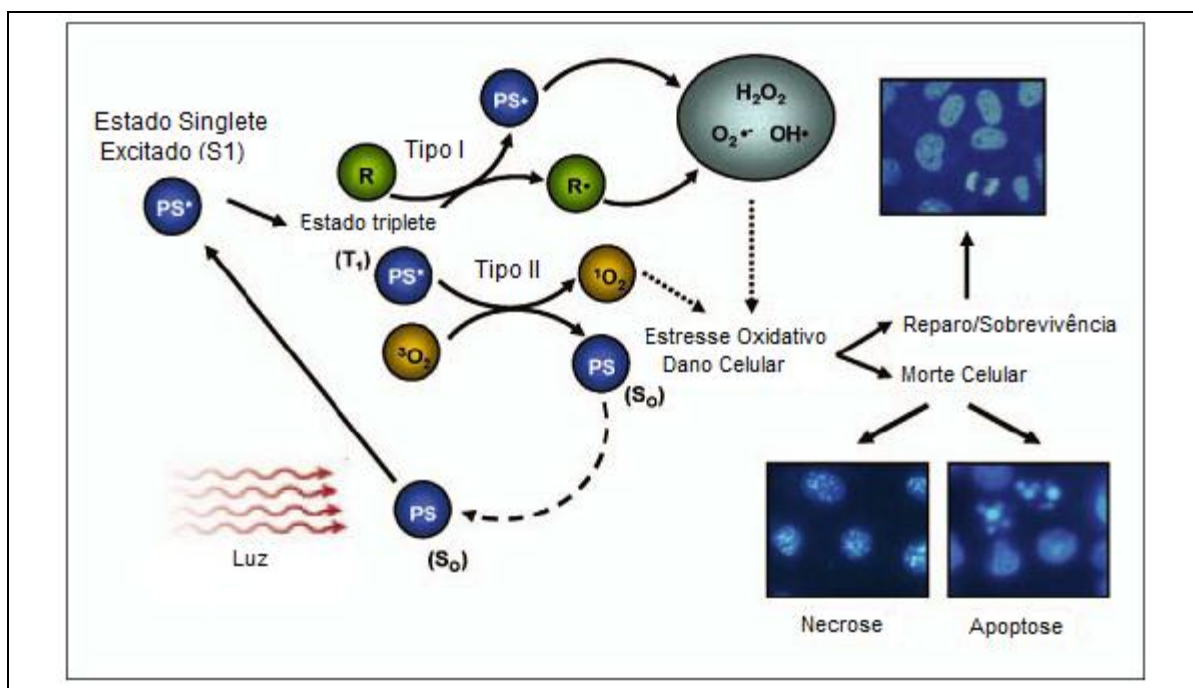


FIGURA 2 – ESQUEMA DO FUNCIONAMENTO DA PDT.

FONTE: adaptado (JUARRANZ *et al.*, 2008).

NOTA: A PDT requer três elementos: PS (fotosensibilizador), luz e oxigênio. Quando expostos à luz em comprimentos de ondas específicos (geralmente acima de 600nm), o PS em seu estado singlete, passa para um estado singlete excitado ( $\text{PS}^*$  - S1), e logo após por uma via que gera o estado tripleto excitado ( $\text{PS}^*$  - T1). A interação de  $\text{PS}^*$  - T1 à substratos biológicos (R) ou à oxigênio molecular ( $^3\text{O}_2$ ), via reação tipo I e II, respectivamente, geram espécies reativas de oxigênio e conseqüente estresse oxidativo, produzindo danos celulares, que podem ser reparados ou levar a morte das células tumorais, geralmente por necrose ou apoptose.

## 2.2. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Consideram-se como ROS todas as moléculas que contêm um oxigênio num estado altamente reativo, com uma alta capacidade oxidativa. O oxigênio molecular ( $O_2$ ) é um birradical que, embora apresente um elétron não emparelhado em cada orbital molecular de mais alta energia, é relativamente estável porque estes elétrons gravitam na mesma direção, impedindo o  $O_2$  de agir como radical livre. A entrada de energia ou de mais um elétron nesta camada leva à formação de espécies químicas como o  $^1O_2$  e o  $O_2^{\bullet-}$  (KOHEN e NYSKA, 2002). O  $H_2O_2$ , diferentemente, tem um número par de elétrons, não possui carga e é pequeno o bastante para atravessar membranas biológicas com extrema rapidez, mas quando entra em contato com íons ferrosos ( $Fe^{2+}$ ), pode receber destes um elétron o que o torna bastante instável e o faz sofrer um cisão liberando um ânion hidroxila ( $OH^-$ ) e um radical hidroxila ( $^{\bullet}OH$ ) – Reação de Fenton (WEINBERG, 1990).

As ROS são produzidas nas células na respiração mitocondrial ou pela exposição a substâncias que estimulem a sua produção. Até a década de 80 as ROS eram tidas basicamente como agentes tóxicos capazes de produzir modificações oxidativas irreversíveis alterando o equilíbrio bioquímico celular de forma letal. Entretanto, nos últimos anos as ROS vêm ganhando um novo papel nos sistemas biológicos, uma vez que vários estudos têm mostrado que baixos níveis de ROS são indispensáveis como mediadores de muitos processos celulares, incluindo diferenciação, progressão do ciclo celular, crescimento, apoptose e imunidade .

Porém, a superprodução de ROS, acima da capacidade natural da ação de antioxidantes pode resultar no estresse oxidativo, que pode causar severas disfunções metabólicas, gerando muitas doenças, incluindo o câncer, pois é conhecido que ROS estão envolvidas na iniciação e promoção de múltiplos estágios da carcinogênese (ABDEL-AZIZ e EL-NAGGAR, 1997).

Para se defender da toxicidade das ROS, as células apresentam alguns mecanismos de defesas. O primeiro mecanismo é a prevenção da formação de ROS através de mecanismos antioxidantes em sentido mais amplo, como por exemplo, o transporte de oxigênio na forma ligada e não livre, a quelação de metais durante

transporte e armazenamento evitando a ocorrência da reação de Fenton, a eficiência da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria que mantém a formação de ROS em nível controlado e a organização estrutural do DNA em cromatina (SIES, 1993).

Outro mecanismo inclui enzimas antioxidantes como superóxido dismutases (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) e pequenas moléculas como a glutathione (GSH) (GADJEVA, DIMOV e GEORGIEVA, 2008).

E por último, existem os mecanismos de reparo quando os demais mecanismos não conseguem impedir a ação das ROS. No DNA, esse reparo aos danos oxidativos podem ser de três formas: reparo de excisão de bases, reparo de excisão de nucleotídeo e reparo de erro de pareamento (LUNEC *et al.*, 2002).

### 2.3. OXIGÊNIO MOLECULAR SINGLETE

O  $^1\text{O}_2$  é um estado excitado do oxigênio molecular, formado pelo fornecimento de energia e com a superação da regra de restrição de spin, originando uma espécie muito mais reativa que o oxigênio molecular. O  $^1\text{O}_2$ , ou singleto, pode existir em dois estados: o  $^1\Delta_g$  com dois elétrons com spin opostos no mesmo orbital  $\pi^*$  e o estado excitado  $^1\Sigma_g$  que possui um elétron em cada orbital  $\pi^*$  degenerado, mas ainda com spins opostos. Este estado excitado tem baixa estabilidade, tendo um tempo de vida muito curto, sendo rapidamente convertido no estado excitado  $^1\Delta_g$ , sendo este o estado de maior interesse e será denominado doravante de  $^1\text{O}_2$ .

O tempo de vida do  $^1\text{O}_2$  em solução é dependente da natureza do solvente, pois este pode transferir sua energia de excitação para o solvente, assim, seu tempo de vida depende em qual solvente é gerado. O tempo de vida do  $^1\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  é aproximadamente 3,8  $\mu\text{s}$  e em  $\text{D}_2\text{O}$  é 62  $\mu\text{s}$ , em hexano 31  $\mu\text{s}$  e em hexafluorbenzeno ( $\text{C}_6\text{F}_6$ ) 3900  $\mu\text{s}$  (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2000).

O  $^1\text{O}_2$  pode ser gerado através da luz UV, através de fontes químicas, por decomposição de endoperóxidos aromáticos, ou por fontes biológicas, em reações catalisadas por mieloperoxidases, por peroxidases de eosinófilos e por ativação de neutrófilos e macrófagos (MORGAN, DEAN e DAVIES, 2004).

Em particular, a decomposição do endoperóxido DHPNO<sub>2</sub>, obtido a partir do derivado de naftaleno (DHPN), apresenta características bastante adequadas para uso em sistemas biológicos, apresenta solubilidade adequada para ser solubilizado em água ou meio de cultura e por ser não iônico, ele é capaz de penetrar nas células. Além disso, sua decomposição é praticamente completa em 2 h a 37°C e 60% do oxigênio liberado está no estado singlete (KLOTZ, BRIVIBA e SIES, 2000).

O <sup>1</sup>O<sub>2</sub> pode interagir com outras moléculas essencialmente por dois caminhos: ao reagir quimicamente ou transferir sua energia de excitação, retornando ao estado fundamental, excitando assim outras moléculas (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2000). Dessa forma, o <sup>1</sup>O<sub>2</sub> pode reagir com DNA, colesterol, lipídios, aminoácidos e proteínas, sendo esta última o maior alvo desta espécie, devido à sua abundância no ambiente onde é normalmente gerado. A reação com proteínas ocorre primariamente nos aminoácidos triptofano, metionina, cisteína, histidina e tirosina nas cadeias laterais, resultando na formação de endo ou hidroperóxidos, tanto em células como em proteínas isoladas (MORGAN, DEAN e DAVIES, 2004).

Entre os danos gerados pelo <sup>1</sup>O<sub>2</sub> em biomoléculas, os mais estudados são os danos ao DNA, sendo que o dano direto é a formação de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina, decorrente da modificação na base nitrogenada da 2'-desoxiguanosina (RAVANAT *et al.*, 2000). O <sup>1</sup>O<sub>2</sub> também é capaz de induzir morte celular por apoptose considerada atípica, na qual ocorre liberação do citocromo c, mas não ocorre ativação da cascata de caspases, visualizada em células de hepatocarcinoma HepG2, HaCat e linhagens de basófilo derivados de leucemia de ratos (OTSU *et al.*, 2005; OTSU *et al.*, 2008).

Já foi mostrado que essa espécie pode estar envolvida em vias de sinalização celular. Tratamentos com rosa bengala para gerar <sup>1</sup>O<sub>2</sub> mostraram a ativação da MAP kinase JNK (KLOTZ, BRIVIBA e SIES, 2000). Queratinócitos pré-incubados com ácido aminolevulínico e irradiadas com luz vermelha mostraram aumento da atividade de JNK e p38, sendo que melanomas tratados nas mesmas condições também mostraram essas alterações, que são importantes para a indução de apoptose. (KLOTZ *et al.*, 1998; BUCHCZYK *et al.*, 2001).

---

## 2.4. MELANINA

A melanina, um pigmento encontrado em muitos organismos e tecidos, pode ser sintetizada pelos melanócitos a partir do processo de oxidação do aminoácido L-tirosina (SEALY *et al.*, 1980). Dois principais tipos de melanina têm sido descritos: eumelanina, característica de peles escuras, e feomelanina, presente principalmente em peles claras (ITO e WAKAMATSU, 2003; MARESCA *et al.*, 2007).

A melanina exerce um papel importante, em relação à susceptibilidade da pele à radiação UV. A eumelanina age como um filtro e possui propriedades que sequestram espécies reativas geradas por UV. Por outro lado, a feomelanina apresenta diferentes propriedades, sendo menos efetiva para filtrar os raios UV e aparentemente age como um fotossensibilizador endógeno (KADEKARO *et al.*, 2003; MEREDITH e SARNA, 2006).

Além da feomelanina, estudos realizados por Maresca e cols. (2006), demonstram a presença de baixos níveis de atividade da catalase e altas concentrações de substratos peroxidáveis em membranas celulares em epidermes com baixa pigmentação em comparação com epiderme de alta pigmentação, mostrando maior susceptibilidade de peles claras a danos por UV. Dados experimentais mostram um possível mecanismo de “feedback” no qual a catalase é induzida em resposta a exposição crônica à baixas doses de estresse oxidativo, como a formação de peróxido de hidrogênio gerado na melanogênese (MARESCA *et al.*, 2008).

A produção de melanina é um processo que envolve uma série de eventos celulares complexos, tendo essa via uma enzima essencial, a tirosinase, que catalisa as etapas iniciais, sendo regulada através de controles transcricionais e mecanismos traducionais (ANCANS *et al.*, 2001). A melanogênese ocorre dentro de organelas intracelulares especializadas, os melanossomos, que são parecidos com lisossomos, principalmente por conterem as mesmas proteínas estruturais (DIMENT *et al.*, 1995). Há evidências que três enzimas fazem parte do início da melanogênese, a PAH (atividade de fenilalanina hidroxilase), a THI (tirosina hidroxilase isoforma 1) e a tirosinase, na chamada “teoria das três enzimas” (SCHALLREUTER *et al.*, 2008).

Essa teoria se baseia no fato de que além das funções já descritas pela tirosinase, as outras enzimas são essenciais: L-DOPA é formada nos melanossomos a partir de L-tirosina pela THI (MARLES *et al.*, 2003) e a concentração de L-tirosina depende da conversão do aminoácido essencial L-fenilalanina pela enzima intracelular PAH (SCHALLREUTER *et al.*, 2008).

A melanogênese apresenta várias formas de regulação, a seguir serão descritas as mais importantes e conhecidas:

- 1) A atividade das enzimas PAH, THI e tirosinase são controladas por um cofator  $6BH_4$  que age como um doador de elétrons para PAH produzir L-tirosina a partir de L-fenilalanina e para THI converter L-tirosina a L-DOPA, além disso,  $6BH_4$  é inibidor alostérico da tirosinase (WOOD *et al.*, 2004; PEY *et al.*, 2006);
- 2) cAMP participa da sinalização da expressão de tirosinase (KORNER e PAWELEK, 1977), também regula a transcrição de THI e regula a fosforilação de PAH via proteína quinase A (PEY *et al.*, 2006);
- 3) A liberação intracelular de cálcio do retículo endoplasmático controla o transporte ativo de L-fenilalanina através da calmodulina dependente de  $Ca^{2+}$ -ATPase, provendo concentrações de L-tirosina para a melanogênese (SCHALLREUTER e WOOD, 1999);
- 4) O peróxido de hidrogênio age diretamente no controle das PAH, THI e da tirosinase (WOOD *et al.*, 2004);
- 5) A maturação dos melanossomos, bem como, a atividade da tirosinase, dependem do pH melanossomal (ANCANS e THODY, 2000);(ANCANS *et al.*, 2001); (FULLER, SPAULDING e SMITH, 2001).

A figura 3 esquematiza algumas dessas regulações no processo da melanogênese, na teoria das três enzimas.



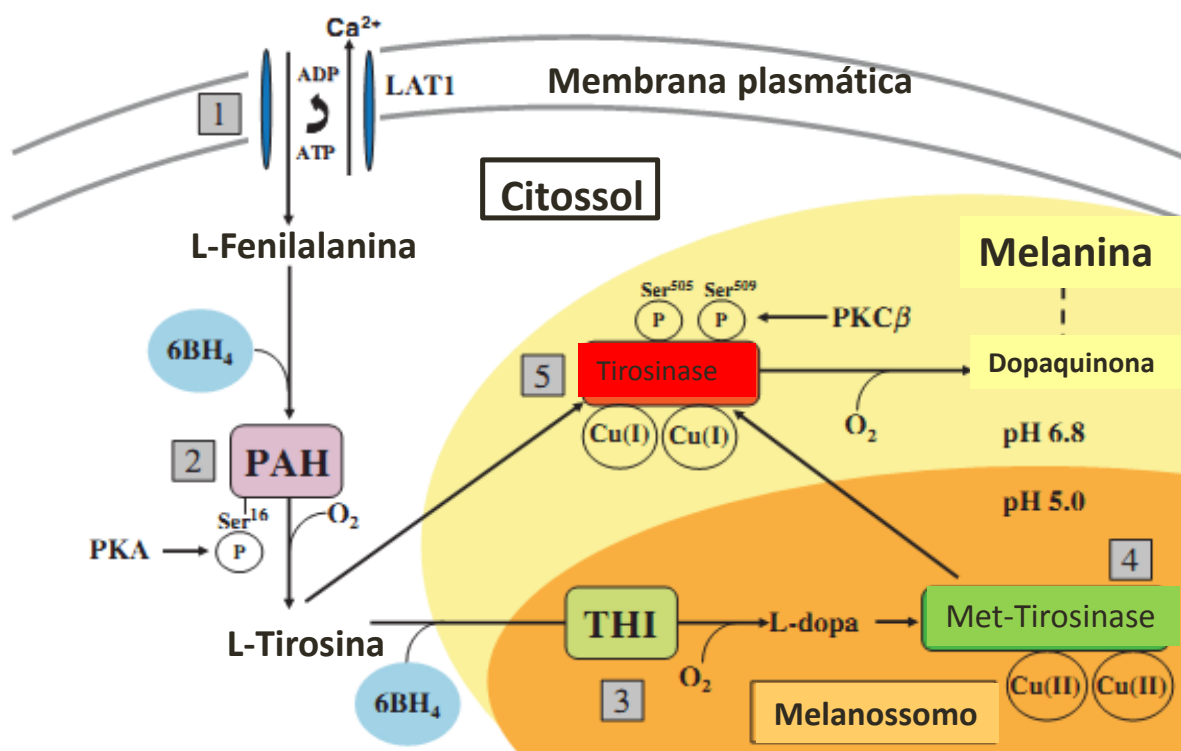


FIGURA 3 - CASCATA DE REGULAÇÃO DA TEORIA DAS TRÊS ENZIMAS NA MELANOGÊNESE

Fonte: (SCHALLREUTER *et al.*, 2008) adaptado

Nota: [1] A entrada de L-fenilalanina é facilitada pelo transporte ativo de  $\text{Ca}^{2+}$  via LAT1; [2] PAH converte L-Fenilalanina em L-tirosina na presença de  $6\text{BH}_4$ ; [3] L-tirosina é substrato de THI, que na presença de  $6\text{BH}_4$ , produz L-DOPA; [4] L-DOPA se liga à met-tirosinase, ativando essa enzima à tirosinase por reduzir o  $\text{Cu}^{2+}$ ; [5] A melanogênese se inicia em pH perto do neutro (pH ótimo da enzima), com a ligação de L-tirosina na tirosinase, com fosforilação das serinas 505 e 509 para ativação da enzima.

A via de produção da melanina inicia-se com a oxidação da L-tirosina à ortoquinona, dopaquinona, seguindo-se por uma sequência de reações (figura 4) até a produção de um pigmento indólico (eumelanina) com auxílio de três enzimas essenciais, tirosinase, TRP-2 (dopacromo tautomerase) e TRP-1 (DHICA oxidase). Pode ainda gerar o pigmento feomelanina que contém subunidades de benzotiazina (RILEY, 2003), sendo que neste caso, somente a tirosinase é necessária (ITO, WAKAMATSU e OZEKI, 2000).

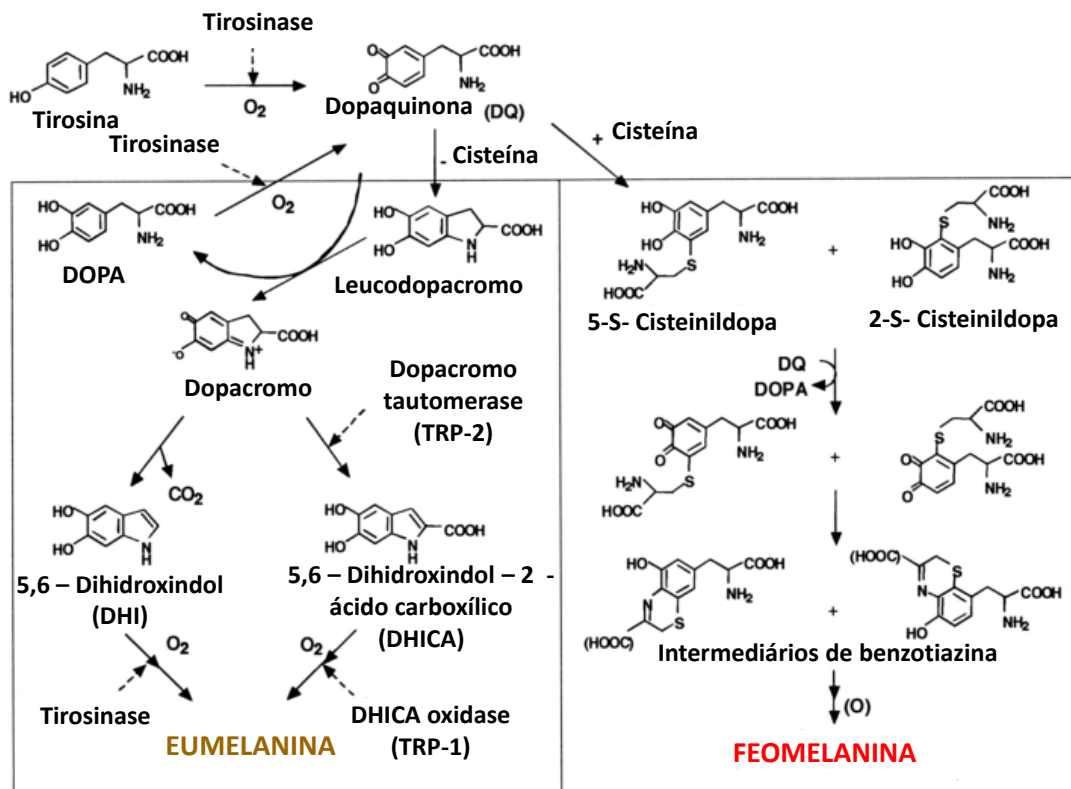


FIGURA 4 - ETAPAS DA BIOSÍNTESE DE MELANINA.

Fonte: (ITO, WAKAMATSU e OZEKI, 2000) adaptado

Nota: Ambas, eumelanina e feomelanina derivam do precursor comum dopaquinona que é formada pela oxidação da L-tirosina sob ação da enzima tirosinase. A dopaquinona é um intermediário altamente reativo e na ausência de compostos tióis, sofre ciclização intramolecular, levando à produção de eumelanina. Entretanto, a presença de tióis, como cisteína, leva a geração de cisteinil-DOPAs, unidades formadoras da feomelanina.

O processo de melanogênese tem sido amplamente estudado, com diferentes formas de estímulo, visando entender a real importância desse processo, principalmente em linhagens tumorais.

O estímulo da melanogênese com 2 mM de L-Tirosina por 24 h em células B16 pode gerar parada de crescimento, sem a morte celular, com a expressão de tirosinases de alta massa molecular glicosiladas (RIEBER e RIEBER, 1993). Apesar desse estímulo ser muito eficaz em experimentos *in vitro*, não estimula a melanogênese *in vivo*, mesmo com auxílio de radiação UV (KONGSHOJ *et al.*, 2007). Outros tipos de compostos podem estimular a melanogênese em diferentes tipos de organismos, em particular, convém destacar o ácido ursólico, pois um estudo mostrou que a sua utilização em células de melanoma B16-F0 aumenta a produção de melanina em 2 vezes após 24 e 48 h de tratamento. Nesse estudo, o estímulo desencadeou uma

---

resistência à apoptose com aumento da expressão de tirosinase e TRP-1 e diminuição de TRP-2 (PINON *et al.*, 2011), sendo portanto, um indicativo da ligação da melanogênese com mecanismos de resistência celulares.

Outro tipo de estímulo que vale a pena destacar foi realizado com o composto MPB (2-mercapto-1-(-4-piridetil)benzimidazol), também testado em células de melanoma murino (B16-F10) que foi capaz de inibir o crescimento celular, aumentar a atividade da tirosinase sem aumentar o conteúdo de AMP cíclico, indicando uma atuação mais direta na via de síntese da melanina e não na sinalização (KOSANO, KAYANUMA e NISHIGORI, 2000).

Além disso, os efeitos da inibição da melanogênese têm sido estudados, não só para determinar esses efeitos, mas também para determinar compostos intracelulares que possam promover essa inibição. Como é o caso do estudo realizado por Garcia-Molina e colaboradores (2010) com NADH. Os autores demonstraram que o NADH pode promover a inibição da melanogênese, em condições aeróbicas, de três formas: por competir com a L-DOPA e L-Tirosina como substrato da tirosinase, pela inativação irreversível da tirosinase atuando como um substrato “suicida” e por redução não-enzimática da dopaquinona. Já em condições anaeróbicas o NADH inibiria irreversivelmente as formas enzimáticas met-TYR e desoxi-TYR. Desta forma, demonstrou-se que o NADH pode participar da regulação da melanogênese.

Em relação aos efeitos da inibição da melanogênese, sabe-se que a inibição da tirosinase através de bloqueio do sítio catalítico com hidroquinonas, sensibiliza as células de melanoma à toxicidade resultante da adição de ciclofosfamida, o que mostra mais uma vez um importante papel da melanogênese na resistência às drogas (SLOMINSKI, ZBYTEK e SLOMINSKI, 2009). Além disso, inibidores da melanogênese, como o ácido kójico (NAWARAK *et al.*, 2008) e [6]-Gingerol (HUANG, CHIU e CHANG, 2011) mostram efeitos tóxicos às células tumorais, evidenciando a importância da melanogênese para a sobrevivência destas células.

---

## 2.5. CICLO CELULAR

O ciclo celular é uma sequência de eventos que inclui a duplicação do conteúdo celular e subsequente divisão celular. Em eucariotos, esse ciclo é dividido em quatro fases: fase G1, síntese de DNA (fase S), fase G2 na qual as células se preparam para divisão e fase M, que é a mitose, na qual os cromossomos se separam e a célula se divide (NORBURY e NURSE, 1992).

A progressão do ciclo celular através das fases é regulada por uma sequência de ativações e inativações em locais chamados de “check points” que monitoram o estado da célula bem como o ambiente intracelular (FOSTER *et al.*, 2011). G1 é a fase crítica de regulação, na qual as células podem entrar no estado de quiescência ou podem continuar se ciclando e replicando. Esse ponto de regulação em G1 é conhecido como “restriction point” e fica entre as duas subfases G1 pós-mitótica (G1-pm) e G1 pré-fase S (G1-ps). O “restriction point” é regulado por sinais de fatores de crescimento, o “cell growth checkpoint” por aporte nutricional. Os pontos de regulação são mecanismos internos de verificação, que impedem o ciclo celular de continuar, diante de alterações que podem trazer danos às células (MURRAY, 1994). Além disso, a mudança de fase no ciclo celular é rigorosamente regulada por quinases dependentes de ciclina (CDKs), que são ativadas quando se ligam a proteínas regulatórias, as ciclinas (HARTWELL *et al.*, 1994).

As CDKs são proteínas quinases que requerem ligação às subunidades das ciclinas para se tornarem ativas. Diferentes membros da família das CDKs, em associação com diferentes ciclinas, representam pontos chaves no ciclo celular. Os complexos ciclina-CDK são regulados por fosforilação e extensas interações proteicas. Como exemplo, na fase G1, fatores de crescimento ou a indução de outros estímulos pode induzir a produção da ciclina D, que se associa com CDK4 e CDK6 e as ativa. Essas quinases entram no ciclo celular por fosforilação da proteína do retinoblastoma (pRb), essa proteína está associada ao fator de transcrição E2F, e somente após a sua hiperfosforilação por outra ciclina (E-CDK2) libera E2F, permitindo a progressão da fase G1 para fase S (FOSTER *et al.*, 2011). A figura 5 resume as fases do ciclo celular, descritas acima.

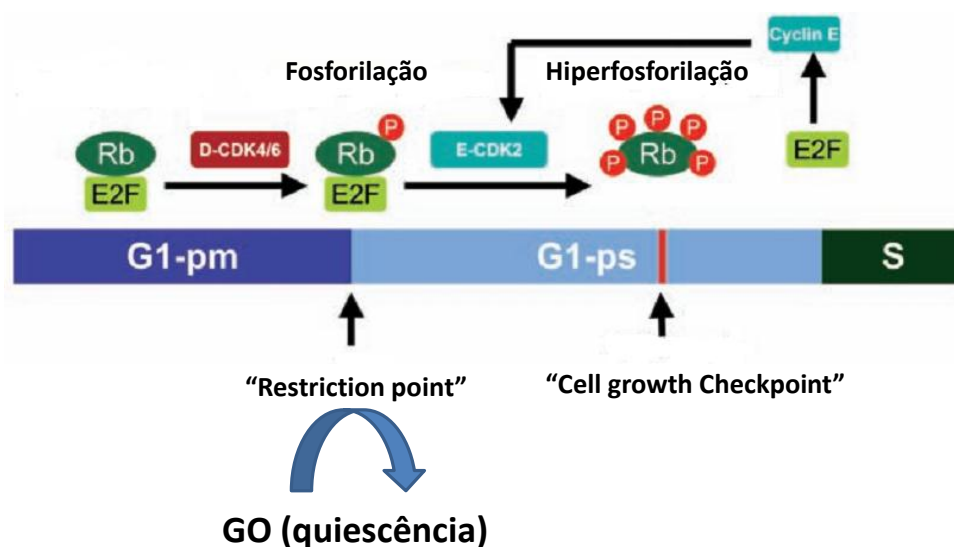


FIGURA 5 - CICLO CELULAR DE MAMÍFEROS.

Fonte: (FOSTER *et al.*, 2011)

Nota: Esse ciclo celular consiste de 2 partes: mitose e intérfase. Durante a intérfase, o genoma é duplicado e é chamado de fase S para síntese. G1 e G2 são as junções entra fase S e mitose. G1 é a fase crítica de regulação, na qual as células podem entrar no estado de quiescência ou podem continuar se ciclando e replicando. Esse ponto de regulação em G1 é conhecido como “restriction point” e fica entre as duas subfases G1-pm (pós-mitótica) e G1-ps (pré-fase S). O “restriction point” é regulado por sinais de fatores de crescimento, o “cell growth checkpoint” por aporte nutricional. O fator de transcrição é liberado após a hiperfosforilação de Rb, pela cascata de ciclina e CDKs ativadas anteriormente.

### 2.5.1. Quinases dependentes de ciclinas (CDKs)

CDKs são proteínas essenciais para o controle do ciclo celular que contém em média 300 aminoácidos e são ativadas durante intervalos específicos do ciclo celular. Há 4 CDKs (CDK1, CDK2, CDK4 e CDK6) que são responsáveis por controlar o ciclo (ELLEGE, 1996). Na transição fase G1 para fase S, CDK4/6 e CDK2 governam a entrada na fase S. CDK2 continua ativa durante a fase S. CDK1 se torna ativa durante a fase G2 e continua ativa até o fim da mitose (SHERR, 1996). Mas quando é necessária a parada do ciclo celular, geralmente detectada nos pontos de regulação, há a expressão dos inibidores de CDKs.

Existem duas famílias de inibidores de CDKs, com múltiplos membros. A primeira família é identificada como Cip1/p21 e são inibidores universais de complexos

---

ciclina/CDK, nessa família incluem-se, p21, p27 e p57 (MATSUOKA *et al.*, 1995). Os membros dessa família se ligam às moléculas de ciclina e de CDK simultaneamente, e além de interagirem com múltiplos complexos, interagem com membros da outra família de inibidores de CDK, a família INK4 (p15, p16, p18 e p19), que se ligam especificamente a complexos ciclina D-CDK (HARPER *et al.*, 1995).

A concentração relativa de cada membro dessas duas famílias e sua distribuição afeta a progressão da fase G1 do ciclo. O p21 tem habilidade de inibir a atividade de CDKs e subsequentemente inibe a replicação do DNA, é também responsável pela maioria dos fenótipos de parada de ciclo em G1 (EL-DEIRY *et al.*, 1994). A parada em G1 permite tempo suficiente para o reparo de danos celulares, portanto, o mecanismo de inibição por p21 é um avanço para a manutenção da integridade genômica. O p27 também tem uma função na regulação no “restriction point”, sendo regulado por mitógenos e por modificações pós-traducionais da proteína p27 (HENGST e REED, 1996).

A ativação ou inativação de inibidores de CDKs são muito estudados em Oncologia, pois alguns inibidores não estão presentes, afetando portanto a regulação do ciclo celular, com consequente proliferação de células anormais, como por exemplo, no melanoma, a perda de p16 está associada a baixas taxas de sobrevivência do portador da doença (POLSKY *et al.*, 2001).

Alguns compostos também são testados para verificar se é possível gerar alterações no ciclo, visando possíveis tratamentos antitumorais, tanto compostos presente na alimentação como drogas farmacêuticas, visto que grande parte dos tumores é desencadeada por mutações ligadas ao funcionamento do ciclo celular.

Proantocianidinas (GSPs) presentes na uva foram testadas em carcinoma epidermóide A431 e induziram inibição da proliferação dessas células tumorais, com parada de ciclo em G1. Houve um aumento dos níveis das proteínas p21 e p27 com diminuição na expressão de CDK2, CDK4 e CDK6 (MEERAN e KATIIYAR, 2007). Polifenóis encontrados no chá verde também induzem parada de ciclo celular, por atuarem no aumento da expressão de proteínas p21 e p27 além de p16, e ainda causarem a diminuição de algumas ciclinas D em células de carcinoma de próstata humana (GUPTA *et al.*, 2000). O resveratrol encontrado em vinhos, também age no

ciclo celular, com diminuição da expressão de ciclinas. Em células de carcinoma epidermóide gerou aumento de p21 e p27 (AHMAD *et al.*, 2001) e em células de câncer de cólo, houve diminuição do complexo ciclina D1/CDK4 (WOLTER *et al.*, 2001).

Além disso, existem estudos que mostram drogas que podem agir em vias paralelas, atuando no ciclo celular indiretamente e inibindo o crescimento tumoral. Como é o caso do uso de BI2536, que é um inibidor seletivo de PLK1, uma proteína superexpressa em tumores, que gera parada de ciclo em G2 em células de melanoma (DE OLIVEIRA *et al.*, 2012). Também inibidores de proteínas do choque térmico, mais especificamente da HSP90. Como exemplo, o uso do inibidor seletivo de HSP90, SNX-2112, causa parada de ciclo celular em G1 e induz apoptose em células de melanoma murino B16 (LIU *et al.*, 2012).

## 2.6. SENESCÊNCIA X QUIESCÊNCIA

Danos celulares podem gerar parada do ciclo na fase G1 através de mecanismos de regulação descritos acima, porém quando não há tempo para o reparo no DNA, ou esse reparo é muito extenso, as células entram no processo de morte celular programada (apoptose) (GARNER e RAJ, 2008).

Entretanto, algumas células não entram em apoptose após os danos celulares, mas seu ciclo celular se torna permanentemente parado e as células não se proliferam. Essa condição é chamada de senescência celular (ČMIELOVÁ e ŘEZÁČOVÁ, 2011). Atualmente, sabe-se que a senescência replicativa nas células ocorre após o encurtamento do telômero, porém a senescência pode ser induzida prematuramente após danos ao DNA, sem relação direta com o encurtamento do telômero (VAVROVA e REZACOVA, 2011).

O aumento da proteína p21 está relacionada com a indução da senescência, tanto na replicativa, quanto na prematura. O aumento na expressão dessa proteína é o primeiro marcador de senescência após a parada do ciclo celular (CMIELOVA *et al.*, 2011).

Em melanócitos, nos quais se observou ativação do AMP cíclico, houve desencadeamento da senescência prematura, com parada de crescimento, aumento da

associação de inibidores de ciclina dependente de kinase, p27 e p16 com CDK2 e CDK4 respectivamente, aumento da proteína de retinoblastoma fosforilada, diminuição nos níveis dos fatores de transcrição E2F1, E2F2 e E2F4, diante disso, uma permanente inabilidade das células em ultrapassar a fase S do ciclo celular (HADDAD *et al.*, 1999).

As células tumorais não entram em senescência permanecendo em proliferação, por isso, a indução da senescência têm sido uma estratégia usada para inibição de tumores (COLLADO e SERRANO, 2006). Em células de melanoma humano, descobriu-se que alguns microRNAs, mais precisamente, miR-203 tem efeito anti-oncogênico, pois induz parada de ciclo celular e aumento da expressão da proteína do retinoblastoma hipofosforilada (NOGUCHI *et al.*, 2012). Além disso, ROS também podem induzir senescência celular (PASSOS *et al.*, 2010), como é o caso do peróxido de hidrogênio que, em baixas concentrações, induz aumento de p21, p53 e parada de ciclo com fenótipo de senescência (CHEN *et al.*, 1998). A radiação UV também é implicada nos processos de senescência, uma vez que células de melanoma em senescência precoce foram encontradas em ratos transgênicos após exposição à UV (HA *et al.*, 2007).

Porém, além da senescência, as células podem entrar em quiescência, que é um mecanismo celular no qual as células entram quando sofrem danos, e que tem como características principais, baixa proliferação celular e queda do metabolismo. Esse mecanismo é conhecido como “dormência” nos casos das células de câncer (OSSOWSKI e AGUIRRE-GHISO, 2010).

Na quiescência há também o aumento da expressão de p21, mas muitos estudos indicam cooperação da manutenção da quiescência por parte de p27 (RIVARD *et al.*, 1996; SGAMBATO *et al.*, 2000).

Sabe-se que em muitos organismos a entrada na quiescência ocorre na fase G1, antes ou no ponto de regulação “restriction point” (HARTWELL *et al.*, 1994). Muitas células vivem parte do tempo no estado quiescente e o retorno ao estado proliferativo é um ponto crítico na sobrevivência celular, pois alterações nesse ponto podem gerar estados proliferativos anormais. Esses mecanismos de transição entre proliferação e quiescência ainda são pouco conhecidos (LAPORTE *et al.*, 2011).



---

Poucos estudos têm sido realizados sobre o estado de quiescência em células metastáticas de melanoma. Ossowski e Aguirre-Ghiso (2010) depreendem que 5% de melanoma uveais demonstra o comportamento quiescente. O estado quiescente em pacientes diagnosticado com tumor é considerado a fase “livre da doença”, pois é o período entre o fim do tratamento e a reincidência. Os sinais que desencadeiam essa volta do tumor ao estado proliferativo ainda não está elucidada, mas os poucos mecanismos descritos mostram que a entrada em quiescência produz subpopulações resistentes a drogas (TAO CHENG, 2000). Porém a entrada na quiescência em células de tumores sólidos pode ser ocasionada devido ao mau funcionamento de algumas vias de sinalização (OSSOWSKI e AGUIRRE-GHISO, 2010).

Mais estudos sobre quiescência celular são necessários para evitar reincidivas e descrever alvos visando a eliminação dessas subpopulações em células tumorais.

---

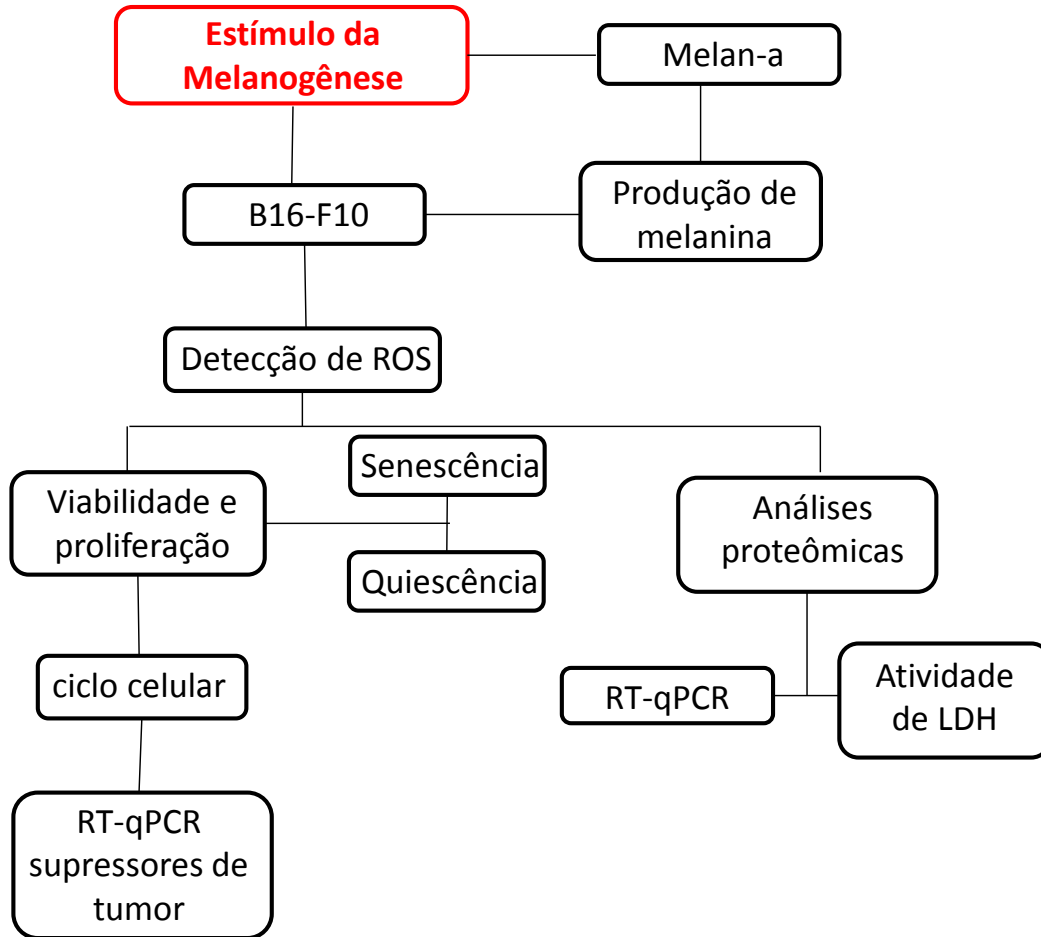
### 3 – JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

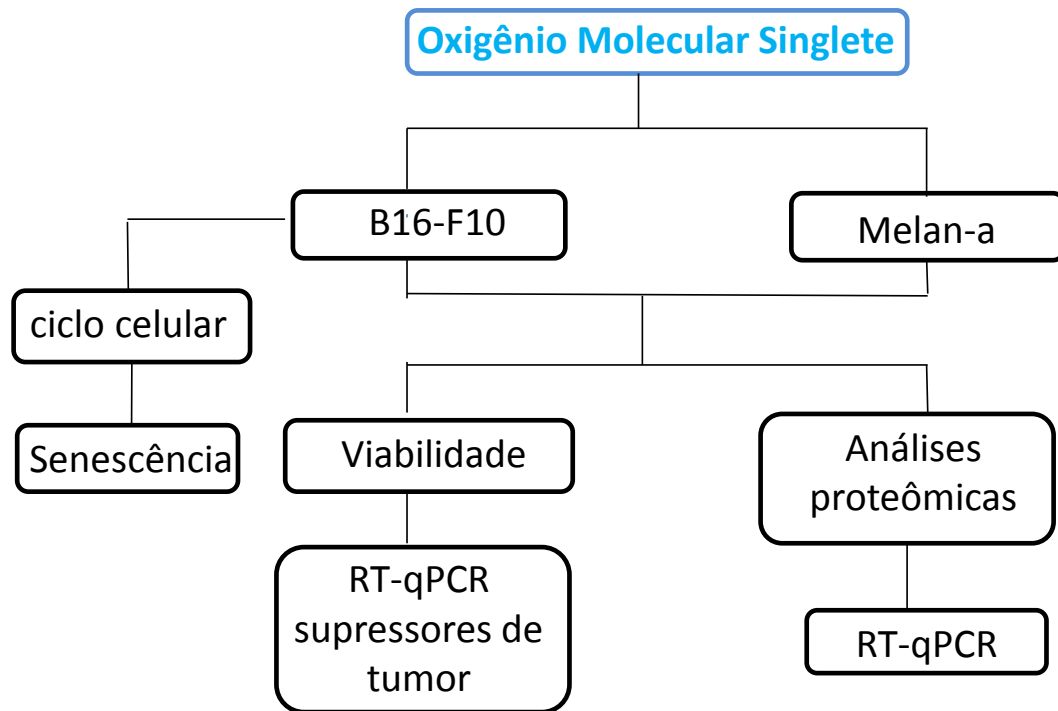
O estímulo da melanogênese em células de melanoma produz diminuição da viabilidade celular, bem como alterações na via de sinalização para apoptose, além de participar dos mecanismos de resistência a drogas (CHEN *et al.*, 2009; PINON *et al.*, 2011). A PDT também é tóxica às células uma vez que gera ROS, principalmente  $^1\text{O}_2$ , podendo afetar mitocôndrias, lisossomos, núcleo, membrana plasmática, além de alterar os mecanismos de adesão celular e o citoesqueleto (JUARRANZ *et al.*, 2008). Os mecanismos de resistência desenvolvidos pelos melanomas contra os componentes tóxicos da via de melanogênese ainda não foram esclarecidos, assim como não se sabe como eliminar as células resistentes à PDT (PERONA e SANCHEZ-PEREZ, 2004).

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo obter informações que permitissem delinear um possível mecanismo de resposta celular frente ao estímulo da melanogênese em células de melanoma murino e frente ao tratamento com gerador de  $^1\text{O}_2$  em células melanoma murino resistentes ao tratamento em comparação com melanócitos murino. Para tanto, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Sob estímulo da melanogênese em células B16-F10 e Melan-a: avaliar a quantidade de melanina produzida.
- Sob estímulo da melanogênese em células B16-F10: avaliar os níveis de ROS; a viabilidade, proliferação, ciclo, senescência e quiescência celular; expressão de supressores de tumor e o perfil proteico.
- Sob tratamento com o gerador de  $^1\text{O}_2$  em células B16-F10 e Melan-a: avaliar a viabilidade, ciclo e senescência celular; a expressão de supressores de tumor e o perfil proteico.

## 4 – ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL





---

## 5 – MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. CULTIVO DE CÉLULAS

#### 5.1.1. Esterilização de Materiais

Os procedimentos com as células foram realizados em capela de fluxo laminar vertical (VECO). Todo material de vidro utilizado para os procedimentos de cultivo celular (frascos de vidro para armazenamento de soluções, equipamento para filtração sob pressão, tampas, pipetas de vidro, eppendorfs e ponteiras de pipetas automáticas) foram esterilizados em autoclave a 120°C por 45 minutos, a 1 atm.

#### 5.1.2. Soluções Tampão e Meios de Cultura

A solução salina-fosfato tamponada (PBS) foi preparada como solução estoque concentrada 5x. Esta solução concentrada continha: NaCl 680 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 13,4 mmol.L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 40,5 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,5). A solução foi esterilizada em autoclave (120°C, 45 minutos, 1 atm), e para o uso foi diluída com água ultrapurificada.

O meio de cultura utilizado neste trabalho foi o meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, Brasil), reconstituído em água ultrapurificada e esterilizado por filtração em membrana de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 µm (Millipore®) sob pressão em aparelho Sartorius. Após o procedimento de filtração, alíquotas do meio foram deixadas em estufa a 37°C, para acompanhamento do aparecimento de eventuais contaminantes. Os meios foram mantidos em geladeira a 4°C. Para os experimentos os meios foram suplementados com 7,5% de soro fetal bovino (SFB) estéril (Gibco), 20 mmol.L<sup>-1</sup> de ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfônico (HEPES) e 8 mmol.L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub> para ajustar o pH em 7,4 e gentamicina (40 mg/mL). No caso da linhagem Melan-a, o meio continha 200 nM do indutor de mitose Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), para que essas células pudessem proliferar paralelamente à linhagem tumorigênica B16-F10.

A solução de tripsina-EDTA era constituída de: NaCl 137 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 5,4 mmol.L<sup>-1</sup>, glucose 5 mmol.L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,42 mmol.L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,44 mmol.L<sup>-1</sup>, NaHCO<sub>3</sub> 2,3 mmol.L<sup>-1</sup>, EDTA 0,53 mmol.L<sup>-1</sup>, 0,05 % (m/v) tripsina (1:250) e 0,002% (m/v) de vermelho de fenol, sendo o pH ajustado para 7,4 com NaHCO<sub>3</sub>. A solução foi esterilizada por filtração em membrana de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 µm (Millipore®).

A solução salina balanceada de Hanks (HBSS) foi preparada a partir de duas soluções: solução A composta de NaCl 2,73 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 107 mmol.L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 25 mmol.L<sup>-1</sup> e MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 27 mmol.L<sup>-1</sup>, e solução B constituída de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,5 mmol.L<sup>-1</sup> e glucose 110 mmol.L<sup>-1</sup>. Estas soluções foram mantidas a 4°C até o momento do uso, quando foram misturadas (1:1) e diluídas (10x) com água ultrapura.

### 5.1.3. Cultura de células

As linhagens utilizadas neste trabalho foram Melan-a e B16-F10 cedidas pelo Professor Dr. Roger Chammas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Essas linhagens foram obtidas de camundongos da linhagem C57BL/6, sendo que a linhagem Melan-a são células de melanócitos e a linhagem B16-F10 de melanoma metastático.

As células foram cultivadas em garrafas estéreis com meio de cultura RPMI 1640, acrescido de 7,5% de SFB e para Melan-a, 200 nM de PMA. O meio de cultura não foi acrescido de PMA nos ensaios de ciclo celular e RT-qPCR dos supressores de tumor. As culturas foram mantidas em incubadora de CO<sub>2</sub> (Sanyo), em atmosfera contendo 2,5% de CO<sub>2</sub>, com umidade controlada de 95% e temperatura constante de 37°C. Para os repiques, as culturas foram incubadas com tripsina-EDTA para desprender as células das garrafas. Para armazenamento das linhagens, as células (10<sup>7</sup> mL<sup>-1</sup>) foram suspensas em meio de cultura, acrescido de soro fetal bovino 7,5% (v/v) e DMSO 10% (v/v), e congeladas inicialmente a -70°C, e a seguir em nitrogênio líquido.

## 5.2 ESTÍMULO DA MELANOGÊNESE E MEDIDA DA PRODUÇÃO DE MELANINA

As células das linhagens Melan-a e B16-F10 ( $5 \times 10^5$  células) foram plaqueadas em placas de 60 mm de diâmetro em meio de cultura e incubadas por 6 h em estufa sob atmosfera a 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  para adesão celular. O estímulo da melanogênese foi feito pela incubação das células por 48 h com meio de cultura suplementado com 0,5 mM ou 1,2 mM de tirosina, ou 0,4 mM de tirosina e 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (HOOGDUIJN *et al.*, 2004). As placas controles continham a mesma quantidade de células e foram incubadas por 48 h com meio RPMI 1640 sem o acréscimo de tirosina e  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Outros controles foram realizados, com incubação das células com meio RPMI1640 acrescido de 0,4 mM de L-tirosina por 48 horas e meio RPMI1640 acrescido de 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

Para a dosagem de melanina, após as 48 h de estímulo, as células foram ressuspensas em solução de EDTA (2 mmol/L) em PBS e a suspensão transferida para um microtubo. Uma alíquota dessa suspensão foi usada para a dosagem de proteínas pelo método de Bradford (1976). A suspensão foi centrifugada a 10000 rpm por 5 min a  $4^\circ\text{C}$  descartando-se o sobrenadante. O *pellet* de células foi utilizado para a determinação da quantidade de melanina. A detecção de melanina foi feita pela incubação do homogeneizado de células “overnight” em NaOH 1M, determinando-se absorbância em leitor de microplacas (TECAN Infinite 200) em 470 nm. Os valores de absorbância foram comparados aos de soluções padrão de melanina e foram feitas correções para concentração de proteínas (KVAM e TYRRELL, 1999).

## 5.3 SÍNTESE DO DHPNO<sub>2</sub>

O derivado de naftaleno N,N'-di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'(1,4-naftilideno) dipropanamida (DHPN) foi sintetizado no laboratório do Professor Dr. Paolo Di Mascio no Instituto de Química da Universidade de São Paulo conforme descrito por Martinez e colaboradores (2000).

A síntese do endoperoxídeo gerador de  $^1\text{O}_2$  (DHPNO<sub>2</sub>) foi realizada como descrito anteriormente (DI MASCIO e SIES, 1989; DEWILDE *et al.*, 1996; MARTINEZ *et al.*, 2000; PIERLOT, 2000; PIERLOT *et al.*, 2000).

A fotossensibilização foi feita utilizando azul de metileno. O DHPN (500 mg) foi dissolvido em 5 mL de água deuterada num frasco isolado termicamente em banho a 4°C. Foram adicionados 200 µL da solução de azul de metileno (10 mmol/L) e a solução foi irradiada com uma lâmpada de Hg (500 W) sob borbulho de oxigênio (O<sub>2</sub>) constante por 3 h. Após esse tempo, a concentração de endoperóxido formado foi determinada a cada h, pela medida de absorbância em 288nm da solução diluída no tempo zero e após incubação desta por 1h a 60°C. A concentração e pureza foram determinadas considerando o  $\epsilon$  (DHPNO<sub>2</sub>) = 140 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> e  $\epsilon$  (DHPN) = 7780 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.

Após atingir pelo menos 80% de pureza, 200 mg de resina ChelexR 100 foram acrescentados à solução, que foi mantida sob agitação por 20 min a 4°C, para fixar o azul de metileno. A solução foi filtrada em membrana polimérica de acetato-nitrato de celulose com poro de 0,45 µm (Millipore®) e armazenada em nitrogênio líquido.

Após o processo de síntese, a concentração final do endoperóxido foi determinada, bem como seu rendimento, pois se perde um pouco do produto na resina.

#### 5.4 TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM DHPNO<sub>2</sub>

Para realização desse ensaio as células Melan-a e B16-F10 foram tratadas por 2 h, a 37°C, com endoperóxido DHPNO<sub>2</sub>, na concentração final de 10 mM no volume final de 2 mL em meio com soro. Também foram feitas incubações com o respectivo endoperóxido previamente aquecido (DHPN) na mesma concentração final (controles). Após o tratamento, o meio contendo endoperóxido foi descartado e as células foram utilizadas ou foram mantidas por mais 14 h com meio de cultura sem tratamento, em incubadora sob atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C dependendo do ensaio a ser realizado.

#### 5.5 MEDIDA DA PRODUÇÃO DE ROS INTRACELULAR

As células B16-F10 foram plaqueadas na densidade de 5 x 10<sup>3</sup> células por poço em placas de 96 poços (6 mm de diâmetro) em meio de crescimento e incubadas em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> durante 24 h para total aderência. As células foram incubadas com meio de cultura contendo os estimulantes L-tirosina (0,4 mM) e



NH<sub>4</sub>Cl (10 mM), junto com a sonda DCFH<sub>2</sub>-DA (5 µM), durante 48 h. Como controle positivo foi utilizado 400 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 30 minutos antes da coleta. A cada hora, as células foram coletadas, lavadas com PBS e analisadas. As análises de citometria de fluxo (FACS) foram então realizadas usando *FACSCalibur* (BD Biosciences, San Jose, CA), monitorando 10.000 eventos no filtro FL1, como descrito anteriormente (WANG *et al.*, 2008). Dados do FACS foram analisados usando o programa *WinMDI* (version 2.9).

## 5.6 TESTES DE VIABILIDADE CELULAR

### 5.6.1 Método de MTT

A determinação da viabilidade celular pelo método do MTT (brometo de 3-metil [4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5difeniltetrazólio) foi realizada de acordo com o descrito (REILLY *et al.*, 1998). Segundo o princípio do método, as células viáveis e metabolicamente ativas reduzem o sal de tetrazólio formando cristais de formazan solúveis em DMSO.

As células foram plaqueadas na densidade de  $5 \times 10^3$  células por poço em placas de 96 poços (6 mm de diâmetro) em meio de crescimento e incubadas em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> durante 24 h para total aderência. Após o período de aderência, as células foram tratadas e após o período do tratamento, o meio de cultura foi descartado e aos poços foram acrescentados 180 µL de HBSS mais 20 µL de solução de MTT de modo a obter-se uma concentração final em MTT de 500 µg/mL, incubando-se por 3 h a 37°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Após a incubação o excesso de MTT foi removido e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em DMSO. A leitura da absorbância em 550 nm foi realizada em leitor de microplacas (*TECAN Infinite 200*), utilizando-se o solvente DMSO como branco. Os resultados foram expressos como porcentagem do controle.

### 5.6.2 Método de Cristal Violeta

A determinação da viabilidade celular pelo método de cristal violeta foi realizada de acordo com o descrito por (GILLIES, DIDIER e DENTON, 1986). O cristal violeta

---

cora ácidos nucleicos das células aderidas e fixadas. As células foram plaqueadas na densidade de  $5 \times 10^3$  células por poço em placas de 96 poços (6 mm de diâmetro) em meio de crescimento e incubadas em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas para total aderência. Após o período de aderência, as células foram tratadas e decorrido o tempo de tratamento, as células foram lavadas com PBS, e posteriormente fixadas com metanol (100%) durante 10 minutos. Após este tempo, o metanol foi retirado e adicionou-se a solução de cristal violeta 0,2% diluída em etanol 2%, durante 3 minutos. Após este tempo o corante foi retirado e foram realizadas lavagens com PBS para a remoção do excesso de corante. Após as lavagens, o cristal violeta foi eluído com solução de citrato de sódio 0,05 mol/L em etanol 50% durante 10 minutos. A absorbância desta solução foi determinada em leitor de microplacas (*TECAN Infinite 200*) em 540 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de células aderidas (coradas) em relação ao controle (considerado como 100%).

## 5.7 CURVAS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

As células B16-F10 foram plaqueadas na densidade de  $3 \times 10^4$  células por poço em placas de 24 poços (15,4 mm de diâmetro) em meio de cultura e incubadas em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> durante 24 h para total aderência. As células foram coletadas durante as 48 h de estímulo da melanogênese e por mais 48 h com meio de cultura normal. As células foram tripsinizadas, ressuspensas em meio de cultura e quantificadas utilizando-se hemocítômetro NEUBAUER de duas câmaras com o auxílio de microscópio óptico.

## 5.8 ANÁLISE DE CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

Foram plaqueadas  $5 \times 10^5$  células em placas de 60 mm em meio de cultura. Após 24 h de adesão, o sobrenadante foi retirado e as células foram tratadas. A seguir, procedeu-se a coleta do sobrenadante e após a retirada do meio, as células foram lavadas duas vezes com PBS, sendo que o PBS das lavagens também foi adicionado ao tubo de coleta do sobrenadante. As células aderidas foram tripsinizadas, e a

suspensão obtida foi adicionada ao mesmo tubo citado anteriormente. O tubo contendo a amostra para análise foi centrifugado (500g por 10 minutos), e o sobrenadante foi descartado, o pellet de células foi ressuspensão em 1 mL de PBS e as células foram fixadas com etanol gelado a 70%, e armazenadas a 4°C por até um mês.

Para a análise, foram acrescentado mais 8 mL de PBS gelado, as células foram centrifugadas (3.000g por 10 minutos), retirado o etanol 70%, o pellet foi lavado duas vezes com PBS, o sobrenadante foi retirado com bastante cuidado e então as células foram ressuspensas em 0,3 mL de tampão hipotônico de iodeto de propídeo por 30 minutos. No aparelho *FACScalibur* (BD Biosciences, San Jose, CA) foram adquiridos 10.000 eventos usando como filtro de fluorescência FL2, e as análises foram feitas usando um histograma (eixo X: filtro FL2, eixo Y: números de eventos) pelo software *FCS Flow Research 4*.

## 5.9 DETERMINAÇÃO DA SENESCÊNCIA ATRAVÉS DO TESTE DA $\beta$ -GALACTOSIDASE

A senescência celular foi avaliada pelo  *$\beta$ -Galactosidase Staining Kit* (Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Esse método é baseado na formação de um composto que produz uma coloração azul em células senescentes em pH 6 devido ao acúmulo da enzima nos lisossomos (DEBACQ-CHAINIAUX *et al.*, 2009). As células B16-F10 foram plaqueadas e após o tratamento, foram lavadas e fixadas (solução de fixação presente no kit). Após 15 minutos de fixação, as células foram incubadas “overnight” com a solução presente no kit que continha além do reativo, X-gal (20mg/mL). Decorrido o tempo de incubação, as células foram analisadas em microscópio óptico ou armazenadas em glicerol (70%) a 4°C.

## 5.10 DETERMINAÇÃO DA QUIESCÊNCIA ATRAVÉS DA FLUORESCÊNCIA DE PYRONIN Y

As células foram coletadas, lavadas duas vezes com PBS e coradas com 10µg/ml de *Hoechst 33342* (Invitrogen) por 45 min a 37°C. Após isso, foi adicionada

diretamente nas células 100µg/ml *Pyronin Y* (Sigma aldrich) por 10 minutos (SHAPIRO, 1981). A fluorescência foi mensurada em leitor de microplacas (*TECAN Infinite 200*), sendo que o corante *Hoechst 33342* é excitado em luz UV e emite a 450 nm, enquanto *Pyronin Y* é excitado a 488 nm e emite em 575 nm. A quantidade de RNA foi normalizada em relação ao número de células viáveis determinada pelo método de MTT conforme descrito no item 5.6.1.

## 5.11 EXPERIMENTOS DE RT-qPCR

### 5.11.1 Extração de RNA

O RNA celular foi extraído utilizando o *kit ilustra RNAspin Mini (GE-Healthcare UK)* seguindo as instruções do fabricante . Após a extração, o RNA foi imediatamente quantificado e submetido a verificação da integridade e armazenado a -80°C. A quantificação foi feita através da medida de absorbância da amostra em 260 e 280 nm (*Nanodrop 1000 – Thermo Scientific*) e a integridade do RNA extraído foi verificada em eletroforese em gel de agarose 0,5%, em tampão TBE (35 V, 400 mA, 3,5 h) e visualização pela coloração com brometo de etídeo. Após confirmação da boa qualidade do mRNA extraído, as etapas subseqüentes foram realizadas.

### 5.11.2 Síntese de cDNA

A síntese do cDNA complementar foi realizada usando um kit convencional *ImProm II Reverse Transcription System (Promega)* que inclui uma transcriptase reversa e um conjunto de reagentes projetados para uma síntese de DNA a partir de de um mRNA poli (A) seguindo as especificações do fabricante. Detalhadamente, 1 µg de RNA total extraído foi transferido para um tubo de 0,5 mL com seu volume final ajustado para 6,5 µL, foi então adicionado 1 µL de enzima DNase I, 1 µL de Tampão para a enzima já suplementado com MgCl e 0,5 µL de inibidor de RNase (RNase Out – *Invitrogen*). Os tubos foram incubados em termociclador (*Eppendorf*) a 37°C por 10 minutos e depois a 70°C por 5 minutos para inativação da enzima. Após o tratamento

---

com DNase I adicionou-se 1 µL de Oligo(dT) para o anelamento com a cauda poli (A) e o tubo foi incubado a 70°C por 5 minutos e rapidamente deixado para resfriar em gelo por mais 5 minutos. Após esta etapa, foi adicionado em cada tubo 10 µL da mistura de reação (contendo transcriptase reversa, tampão, MgCl, dNTPs e inibidor de RNase), seguindo-se incubação a 25°C por 5 minutos. Após este tempo de incubação, a síntese ocorreu a 42°C por 60 minutos e a enzima foi inativada a 70°C por 15 minutos. O cDNA recém sintetizado foi diluído 1:3 com água livre de RNase e armazenado a -80°C.

### 5.11.3 RT-qPCR

O cDNA sintetizado foi submetido a análise da expressão gênica através de PCR Quantitativo em tempo real (RT-qPCR), utilizando iniciadores específicos para os genes p19, p21, p27, p53, ornitina aminotransferase (OAT), HSP90, imentina, piruvato kinase isoenzima M2 (PKM2) e ATP sintase subunidade F1 mitocondrial (ATP sintase) (tabela 1).

A reação de RT-qPCR foi realizada no equipamento *Rotor-Gene Q* (Corbett Research) utilizando os reagentes do *kit Rotor-Gene SYBR Green PCR* (Qiagen). A mistura de reação teve um volume final de 18 µL, sendo constituída por: 4,5 µL de cDNA 1:30; 4,5 µL dos iniciadores F (forward) e R (reverse); e 9 µL de *Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix* (HotStarTaq Plus DNA polimerase; Tampão da polimerase; mistura de dNTPs; água livre de RNase). Para realização das reações as amostras foram incubadas a 95°C durante 5 minutos. Após este tempo, foram realizados cerca de 45 ciclos de amplificação para cada gene testado, sendo que as amostras ficaram 10 segundos a 95°C e 20 segundos a 60°C em cada ciclo. A dissociação foi realizada variando-se a temperatura de 60°C a 90°C. Os valores de CT dos genes alvo foram representados como unidades relativas de expressão, normalizados por genes de controle interno como GAPDH e HPRT. Esta normalização foi realizada pelo software *geNorm* 3.4 (VANDESOMPELE *et al.*, 2002).

TABELA 1 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA A REAÇÃO DE RT-qPCR

F_p19 (400 nmol/L)	5'-GGAGCTGGTGCATCCTGAC-3'
R_p19 (400 nmol/L)	5'-GTACCGGAGGCATCTTGGA-3'
F_p21 (400 nmol/L)	5'-AATGGAGACAGAGACCCCAGATAA-3'
R_p21 (400 nmol/L)	5'-GGACATCACCAGGATTGGACATG-3'
F_p27 (600 nmol/L)	5'-TTCGACGCCAGACGTAAACAG-3'
R_p27 (600 nmol/L)	5'-CATTCAATGGAGTCAGCGATATGTA-3'
F_p53 (600 nmol/L)	5'-GGAAATTTGTATCCCGAGTATCTG-3'
R_p53 (600 nmol/L)	5'-TGGATGGTGGTATACTCAGAGC-3'
F_ornitina aminotransferase (800 nmol/L)	5'-GCTGCCCTCTGACGTTGTGACCT-3'
R_ornitina aminotransferase (800 nmol/L)	5'-CGCAGGCACACCTTCCAAGCATC-3'
F_HSP90 (600 nmol/L)	5'-CTTGCCGTGCGAGTCGGACTIONG-3'
R_HSP90 (600 nmol/L)	5'-AGGCAAAGGTCTCCACCTCCTC-3'
F_vimentina (400 nmol/L)	5'-CGGCTGCGAGAGAAATTGCAGG-3'
R_vimentina (400 nmol/L)	5'-GTTCAAGGTCAAGACGTGCCAGAG-3'
F_piruvato kinase isozyme M2 (400 nmol/L)	5'-TATCGCAGCAGGAACCGAAGTACGC-3'
R_piruvato kinase isozyme M2 (400 nmol/L)	5'-TGCATGGAGCTGCTGGGTCTGAA-3'
F_mitochondrial ATP sintase (600 nmol/L)	5'-CCGACATGGGCACAATGCAGGAA-3'
R_mitochondrial ATP sintase (600 nmol/L)	5'-ATGGGCAAAGGTGGTTGCAGGG-3'
F_GAPDH (600 nmol/L)	5'-ATCTTCTTGTGCAGTGCCAG-3'
R_GAPDH (600 nmol/L)	5'-GGCAACAATCTCCACTTTGCC-3'
F_HPRT (800 nmol/L)	5'-TCCCTGGTTAAGCAGTACAGCCCC-3'
R_HPRT (800 nmol/L)	5'-AGTCTGGCCTGTATCCAACACTTCG-3'

## 5.12 ANÁLISES PROTEÔMICAS

### 5.12.1 Lise celular e solubilização das proteínas

As células foram plaqueadas, tratadas e então retiradas com *scraper* e PBS. Após centrifugação, foram ressuspensas em 500 µL do tampão de extração (7M uréia, 2M tiouréia, 1M Tris, 4% 3-[(3-colamidopropil) dimetilamônio]-1-propanosulfonato (CHAPS) e 1 mM fenilmetanosulfonilfluorido (PMSF), submetidas a três ciclos de sonicação a 4°C, seguindo-se centrifugação a 18500g por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi

coletado e o conteúdo de proteína quantificado pelo *kit 2-DE quant* da GE Healthcare, usando albumina bovina sérica como padrão.

#### 5.12.2 Eletroforese bidimensional (2-DE)

A técnica da eletroforese bidimensional (2-DE) resulta da combinação da focalização isoeletrica e a eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante. A focalização isoeletrica foi realizada em unidades de focalização isoeletrica *IPGphor* (GE Healthcare,). As fitas ou *strips* IPG (gradiente de pH imobilizado) com gradiente de pH não-linear de 3-10 ou linear pH 4-7, de 13 cm foram reidratadas em 300 µL de tampão de reidratação que continha 500 µg de proteína, 7 M de uréia, 2 M de tiouréia, 1M de Tris, 60 mM de ditioneitol (DTT), 2% de tampão IPG pH 3-10 não-linear ou IPG pH 4-7 linear, 65mM (4%) de CHAPS. A Focalização foi realizada com 12 h de reidratação, seguida de 500V durante 1 h; no segundo estágio 1000V durante 1 h; e no terceiro estágio 8000V até atingir 28000Vh (Culp *et al.*, 2006), sendo 50 µA/fita. Imediatamente após o término da focalização isoeletrica as fitas IPG foram equilibradas para a segunda dimensão (SDS-PAGE) ou congeladas a -70°C.

As fitas IPG foram equilibradas em duas etapas: a primeira durante 10 min em tampão contendo 6 M de uréia, 30% de glicerol, 2% de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), 50 mM de Tris-HCl (pH 8,8) e 1% de DTT e a segunda, durante 12 min no mesmo tampão, substituindo-se DTT por 2,5% de iodoacetamida.

Em seguida, as tiras foram encaminhadas para a etapa de SDS-PAGE, que foi feita em sistema *Ruby* (GE Healthcare), usando gel de 12,5% de poliacrilamida. A tira da Focalização Isoeletrica (IEF) foi colocada na parte superior do gel e fixada com 0,5% agarose. A eletroforese foi conduzida por 60V até a amostra ultrapassar o gel de empilhamento e depois a 30mA/gel, 300 V, 6 W, 4°C até que o bromofenol alcançasse a extremidade do gel de corrida (cerca de 4 h). As proteínas foram coradas com protocolo de *Comassie colloidal* G-250. Em seguida, os géis foram escaneados no *ImageScanner data acquisition system* (GE Healthcare). A detecção, mapeamento, determinação do volume do *spots*, e comparação entre os géis foram feitas usando o software *ImageMaster-2-DE Platinum* version 6.0 (GE Healthcare).

### 5.12.3 Análise por espectrometria de massas (MALDI-TOF)

Os *spots* excisados dos géis 2-DE foram digeridos com tripsina, conforme descrito anteriormente (WILLIAMS e STONE, 1997). As amostras tripsinizadas foram misturadas com a solução de matriz (5 mg/mL ácido  $\alpha$ -Ciano-4-hidroxicinâmico - CHCA em 50% acetonitrila, 0.1% (v/v) ácido trifluoroacético - TFA) na razão 1:1 e foram aplicadas na placa de 96 poços - MTP 384 Target Plate Ground Steel (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). As amostras foram analisadas por espectrometria de massa *MALDI-TOF* (Bruker Autoflex III, Bruker Daltonics, Inc., Bremen, Germany). O Software MASCOT search engine (<http://www.matrixscience.com>) foi usado para *peptide mass fingerprinting* (PMF). Massa monoisotópica foi utilizada como um parâmetro de busca, incorporando oxidação dos resíduos de metionina e carbamidometilação dos resíduos de cisteína. A busca por identificação de proteínas foi realizada usando o banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information).

### 5.13 MEDIDA DA ATIVIDADE DE LACTATO DESIDROGENASE

As células B16-F10 foram plaqueadas e após estímulo da melanogênese, foram lavadas com PBS, coletadas e centrifugadas a 2000rpm por 5 minutos e submetidas a três ciclos de sonicação a 4°C. O sobrenadante foi coletado, sendo uma alíquota separada para posterior dosagem de proteínas. A reação foi realizada a 37°C em 0,1 M de tampão fosfato (pH 7,4) contendo 1,2 mM de piruvato e 3 mM de NADH (KEIDING *et al.*, 1974). Na reação continha 60  $\mu$ L de amostra e 140  $\mu$ L do tampão de reação. O consumo de NADH foi acompanhada em leitor de microplacas (TECAN *Infinite* 200) a 340 nm e a mudança na absorção por minuto foi determinada em intervalos de 1 minuto até um tempo total de 10 minutos. Para determinar a atividade específica da enzima, os valores de atividade, em U/mL, foram convertidos a U/L e então normalizados com a concentração proteica das amostras.



---

## 5.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações entre géis 2-DE foram baseadas nas porcentagens de volume dos *spots* presentes em todas as três replicatas de cada condição usando o “Student’s t-test”. As porcentagens de volume dos *spots* com valor de  $p < 0,05$  foram consideradas como alterações significativas na regulação protéica.

Nos demais experimentos, os dados foram apresentados como a média com desvio padrão e os testes utilizados foram “Student’s t-test” ou ANOVA de acordo com adequação de cada ensaio.

## 6- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. EFEITO DO ESTÍMULO DA MELANOGÊNESE EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16-F10 E MELANÓCITOS MELAN-A

#### 6.1.1. Estímulo da melanogênese

A melanina, um pigmento encontrado em muitos organismos e tecidos, pode ser sintetizada pelos melanócitos a partir do processo de oxidação do aminoácido L-tirosina (SEALY R. C., 1980) sob ação da enzima tirosinase (ITO, WAKAMATSU e OZEKI, 2000). Com base nesta informação, no presente estudo, foram testados os seguintes protocolos de indução da melanogênese - suplementação com aminoácido L-tirosina ao meio de cultura nas concentrações 0,5 mM e 1,2 mM e suplementação com o aminoácido na concentração de 0,4 mM mais  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10 mM), sendo todos os protocolos por 48 horas. Sabe-se que o  $\text{NH}_4\text{Cl}$  é importante por neutralizar o pH dos melanossomos, pois os melanossomos são organelas ácidas, e a enzima tirosinase de mamíferos tem sua atividade máxima em pH neutro, sendo portanto o pH melanossomal um mecanismo de controle da melanogênese (ANCANS *et al.*, 2001).

Após os estímulos, a quantidade de melanina foi determinada. Conforme mostra a figura 6A, a melanogênese na linhagem Melan-a foi estimulada igualmente nas condições de suplementação com 0,5 e 1,2 mM de L-tirosina. No caso da linhagem B16-F10, houve estímulo com L-tirosina, mas o estímulo com 0,4 mM de L-tirosina acrescido de 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (figura 6B e C) induziu ainda mais a síntese de melanina, como já havia sido mostrado por (HOOGDUIJN *et al.*, 2004). Com o protocolo de estímulo usando L-tirosina e  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , as células Melan-a perderam completamente a viabilidade (dados não mostrados).

Também é possível observar algumas células mais espalhadas e a melanina dentro das células B16-F10 (figura 6B) após o período de 48 h com suplementação de L-tirosina e  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

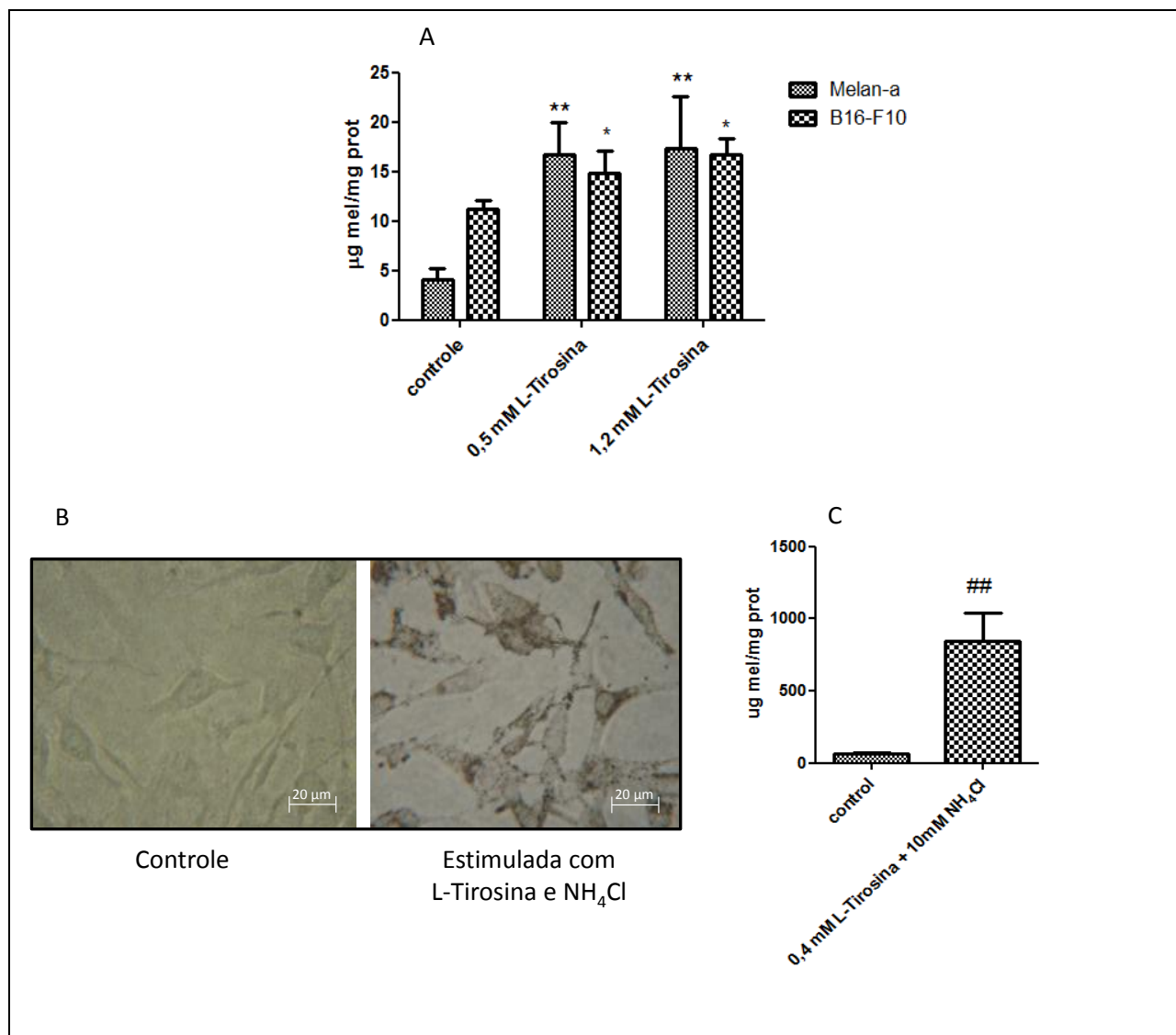


FIGURA 6 – ESTÍMULO DA MELANOGÊNESE APÓS 48 h.

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: (A) Quantidade de melanina nas células Melan-a e B16-F10 por 48 horas na ausência (controle) ou presença de 0,5 mM e 1,2 mM de L-Tirosina em meio RPMI1640; (B) Micrografia das células B16-F10 com ou sem estímulo da melanogênese (controle em meio RPMI1640). As fotos foram obtidas com câmera fotográfica digital acoplada no microscópio invertido. (C) Quantidade de melanina nas células B16-F10 por 48 horas na ausência (controle) e 0,4 mM de L-Tirosina com 10 mM de NH<sub>4</sub>Cl em meio RPMI1640. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; ##  $p < 0,001$  em relação aos controles das respectivas linhagens).

Embora as linhagens tenham sido estimuladas somente com L-tirosina, particularmente para as células B16-F10, a quantidade de melanina foi muito superior quando estimuladas com L-tirosina e NH<sub>4</sub>Cl. Como o foco do estudo era verificar se o excesso de melanina geraria alterações celulares importantes, o protocolo escolhido foi

---

L-tirosina com  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , na linhagem B16-F10, pois a linhagem Melan-a não produziu melanina em grande quantidade somente com L-tirosina.

Essas diferenças de produção da melanina entre as linhagens de melanócito e melanoma indicam uma resposta diferenciada de cada linhagem ao estímulo, e isso está de acordo com estudos anteriores (FULLER, IMAN e LUNSFORD, 1988; JIMENEZ *et al.*, 1988; BURCHILL *et al.*, 1991) que mostraram que células com quantidades similares de tirosinase apresentam diferenças na atividade dessa enzima e como consequência na melanogênese, sugerindo que a tirosinase não age necessariamente da mesma forma, comprovando que sua ativação é um importante ponto de regulação da síntese de melanina (ANCANS, HOOGDUIJN e THODY, 2001; ANCANS *et al.*, 2001).

Os melanossomos são organelas ácidas (BHATNAGAR *et al.*, 1993), o que justifica o estímulo da melanogênese com adição de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; uma vez que este, por ser uma base fraca lisossomotrófica (SAEKI e OIKAWA, 1983), neutraliza o pH dos melanossomos favorecendo a atividade da enzima tirosinase, cujo pH ótimo é neutro (ANCANS *et al.*, 2001). Além disso, o  $\text{NH}_4\text{Cl}$  favorece a maturação dos melanossomos (OIKAWA *et al.*, 1987). Os melanossomos de caucasianos e melanócitos de negros apresentam diferenças no pH (FULLER, SPAULDING e SMITH, 2001), sendo este um dos pontos de regulação da melanogênese e é mantido por uma bomba de prótons e pela proteína P (ANCANS, HOOGDUIJN e THODY, 2001)(Figura 7).

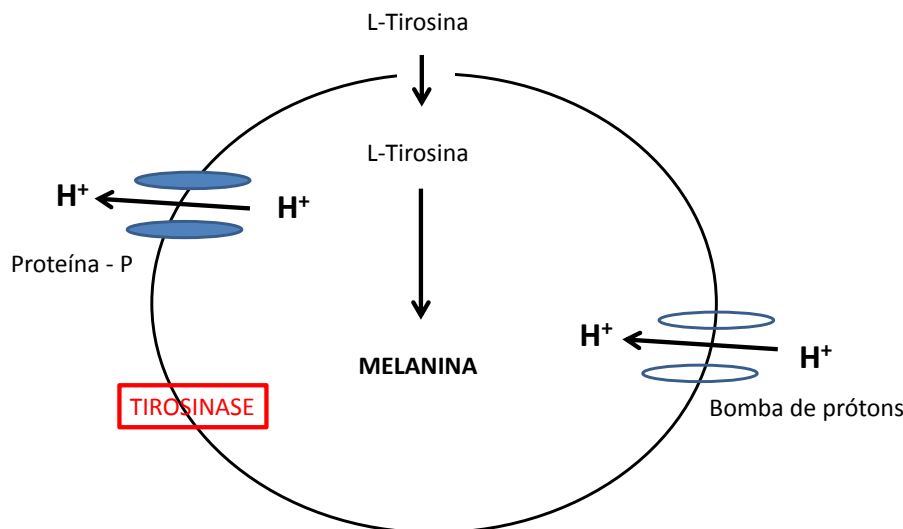


FIGURA 7: MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA MELANOGÊNESE POR MUDANÇAS NO PH

FONTE: (ANCANS *et al.*, 2001) adaptado.

NOTA: O pH melanossomal é controlado e mantido por uma bomba de prótons e pela proteína P. A abundância, poliformismo e atividade dessas proteínas podem servir como fatores de regulatórios da melanogênese.

Estudos anteriores comparando linhagens de melanócitos Melan-a e Melan-b (com expressão normal de proteína p) e Melan-p1 (não expressa proteína P), mostraram que a linhagem que não tem proteína P, produz muito mais melanina (em relação ao seu controle) quando em contato com neutralizantes do pH como NH<sub>4</sub>Cl, e aquelas que possuem proteína P não apresentam aumento na sua produção de melanina (ANCANS, HOOGDUIJN e THODY, 2001).

A alteração vista entre os estímulos da melanogênese entre as linhagens de melanócito e melanoma pode estar associada a esse aspecto, pois já foi demonstrado que a expressão da proteína P e de outras proteínas relacionadas à melanogênese, são menores em linhagens de nevo displásico, que é a primeira etapa de tumorigênese em melanomas (HASHIMOTO *et al.*, 2006). Como a linhagem em estudo, B16-F10 é uma linhagem maligna metastática, acreditamos que a expressão de proteína p seja inferior à expressão em linhagens normais, o que acarretaria em uma melhor resposta de indução da melanogênese na presença do NH<sub>4</sub>Cl.

### 6.1.2. Produção de ROS

A síntese de melanina *in vitro* gera  $H_2O_2$  em reações de polimerização envolvendo quinonas (NAPPI, 1996). Vários autores têm discutido a cerca dos efeitos celulares da melanogênese, pois evidências indicam que há produção de ROS durante o processo de síntese de melanina (SZATROWSKI e NATHAN, 1991; PAVEL *et al.*, 2004). Na verdade, Nappi e Vass (1996) também propuseram que o processo da melanogênese envolve produção de ROS; entretanto, eles demonstraram somente formação de  $H_2O_2$  por auto-oxidação e polimerização enzimática da melanina mediada.

Para verificar se essa produção de ROS também acontece dentro das células, foram realizados ensaios com a sonda DCFH<sub>2</sub>-DA. Nesse experimento, a sonda é difundida facilmente através da membrana celular, após a entrada, sofre ação de esterases e é desacetilada a DCFH<sub>2</sub>. O composto DCFH<sub>2</sub> é impermeável ficando dentro da célula e quando sofre oxidação pelas espécies reativas, se torna DCF que é fluorescente (figura 8) (BRANDT e KESTON, 1965; ROSENKRANZ *et al.*, 1992).

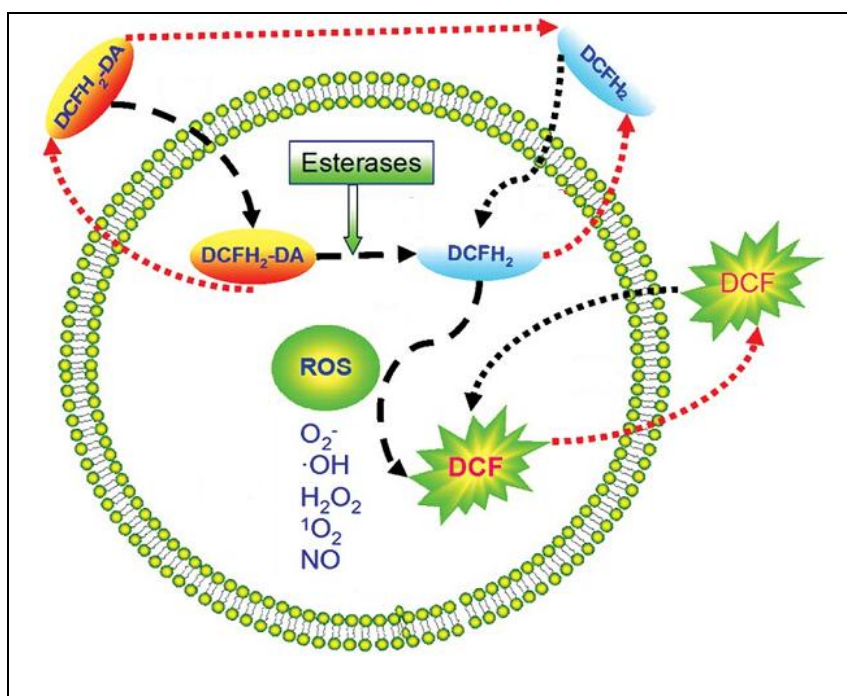


FIGURA 8 – MECANISMO GERAL DA SONDA DCFH<sub>2</sub>-DA INTRACELULAR

FONTE: (CHEN *et al.*, 2010) modificado

NOTA: Nesse sistema a sonda DCFH<sub>2</sub>-DA é internalizada, e então sofre desacetilação por esterases intracelulares, tornando-se impermeável. O produto DCF gerado pela oxidação de DCFH<sub>2</sub> por ROS produzidos é fluorescente, podendo ser medido e quantificado.

---

Neste trabalho a produção de ROS em células foi detectada durante o estímulo da melanogênese na linhagem B16-F10. A sonda foi incubada juntamente com o meio de cultura contendo os estimulantes (L-Tirosina e  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) e a medida da fluorescência foi realizada de hora em hora, durante as 48 h de estímulo. Foi utilizado como controle positivo 400  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 30 minutos.

Os resultados desse experimento estão apresentados na figura 9. O pico de produção de ROS foi entre 15 e 18 h após a adição do meio de cultura contendo L-tyrosina e  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , com os níveis de ROS baixando após 21 h e mantendo seus níveis baixos até às 48 h de estímulo.

Esses experimentos mostram a produção de ROS durante a melanogênese, e que, apesar de gerar um estresse oxidativo nas células, pode também contribuir para o próprio processo de melanogênese. De fato, foi mostrado que a enzima tirosinase é ativada e superexpressa por baixas concentrações (níveis de  $\mu\text{M}$ ) de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (WOOD *et al.*, 2004). Portanto, a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  faz parte dos mecanismos necessários para a produção de melanina, apesar de o  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado durante a melanogênese ativar fatores de transcrição, e conseqüentemente, a expressão de genes e proteínas, podendo gerar desativação de importantes vias de sinalização, como ativação de proteínas envolvidas com ciclo celular, p53 e p21, aumento de proteínas ligadas a apoptose (Bax e Bcl-2), dentre outros (SAROSI, RIEBER e RIEBER, 2003; SPENCER *et al.*, 2006).

Com base nessas informações, e na constatação da formação de ROS intracelular durante o estímulo da melanogênese, foram investigadas as alterações celulares geradas com esse estímulo.

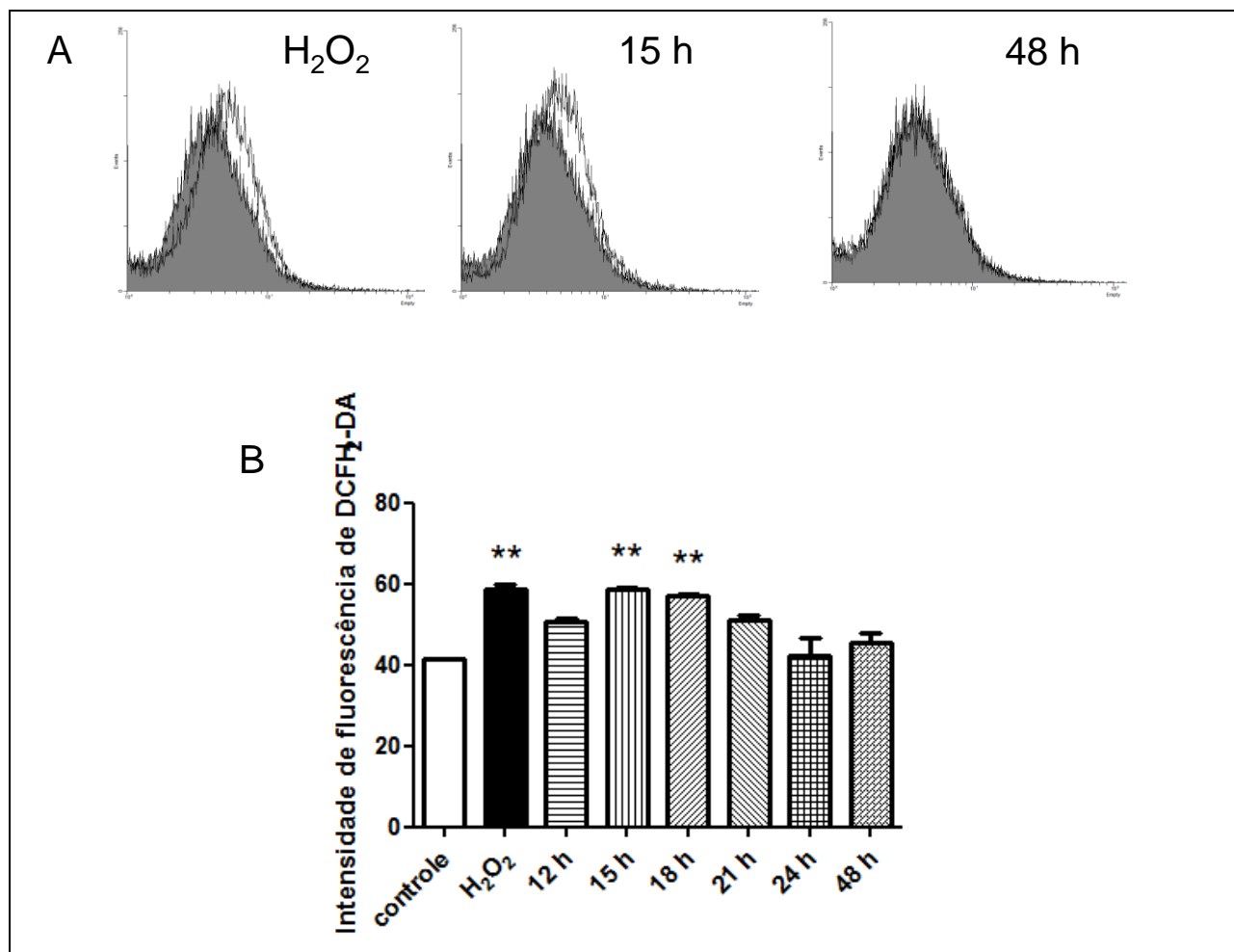


FIGURA 9 – PRODUÇÃO DE ROS DURANTE O ESTÍMULO DA MELANOGENESE POR 48 H.

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: (A) A análise de ROS por citometria de fluxo foi realizada com sonda DCFH<sub>2</sub>-DA em diferentes tempos de estímulo (linhas pretas) comparando com o respectivo tempo dos controles (curva cheia). Foi utilizado 400  $\mu$ M de  $H_2O_2$  por 30 minutos como controle positivo. As análises foram realizadas usando o equipamento FACSCalibur (com filtro FL1 e aquisição de 10000 eventos). (B) Dados de citometria analisados com o programa *WinMDI* (version 2.9). Os controles são células cultivadas em meio RPMI1640 na ausência dos estimulantes, e os tratamentos continham suplementação do meio de cultura com 0,4 mM de L-tirosina e 10 mM de  $NH_4Cl$ . Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes (\* $p < 0,05$ ).

### 6.1.3. Proliferação e Viabilidade Celular

A avaliação de danos ao DNA por ensaio cometa em melanócitos, que tiveram a biossíntese de melanina induzida, mostrou um aumento no dano ao DNA dessas células quando expostas à radiação UVA (320-400 nm)(MARROT *et al.*, 1999), indicando uma relação importante entre danos ao DNA e melanogênese. De fato,



estudos na ausência de irradiação, mostraram que a melanina promove quebras no DNA e, ainda, que sua interação com o DNA impede a ação de enzimas de reparo (SUZUKAWA *et al.*, 2012).

Para avaliar se a condição de estímulo da melanogênese poderia exercer um efeito tóxico nas células B16-F10, uma vez que, a elevação dos níveis de ROS foi detectada, a viabilidade celular foi avaliada através do teste de MTT (REILLY *et al.*, 1998). Para cumprir esse objetivo, a quantidade de células viáveis foi determinada logo após estímulo da melanogênese em 48 h e também após 14 h a partir do fim do estímulo (troca do meio com estimulantes pelo meio normal). Esse tempo de 14 horas foi determinado para avaliar a resposta tardia das células, visando-se detectar possíveis processos de recuperação celular. Como mostra a figura 10A, foi observada uma diminuição em aproximadamente 30% na viabilidade celular após o estímulo da melanogênese, tanto após o fim do estímulo (dados não mostrados) como após 14 h.

Estes resultados sugerem que o estímulo da melanogênese promove toxicidade sobre estas células. Por outro lado, (PINON *et al.*, 2011) mostraram que a melanina pode atuar como protetora das células de melanoma ao retardar a apoptose. Em adição, outros estudos mostram que a melanogênese poderia afetar o crescimento celular por aumentar a ligação entre inibidores de CDKs com estas ciclinas (HADDAD *et al.*, 1999). Desta forma, foi avaliada se a redução na viabilidade celular observada na linhagem B16-F10 após o estímulo da melanogênese seria causada pelo aumento de morte celular ou parada na proliferação. Assim, foram realizadas curvas de proliferação, nas quais as células foram plaqueadas e mantidas em meio contendo L-tirosina/  $\text{NH}_4\text{Cl}$  por 48 h e depois mantidas por mais 48 h em meio sem estimulantes. A cada 24 h, as células foram tripsinizadas e contadas em câmaras de Neubauer e as taxas de crescimento de células controle e estimuladas foram comparadas. Os resultados da figura 10B mostram que após 48 h, as células estimuladas param de crescer e essa inibição da proliferação continua por mais 24 h após a remoção do estímulo (figura 10B).

Apesar dos dados de viabilidade celular e da curva de crescimento estarem de acordo, surgiu a dúvida se os dados de viabilidade refletiam de fato uma diminuição de células vivas, pois o método de MTT mede alterações nas desidrogenases

---

mitocondriais, podendo indicar somente alterações metabólicas, e já foi descrito que o processo de melanogênese pode afetar os níveis de NADH (GARCIA-MOLINA *et al.*, 2010) e estar envolvido com o metabolismo da glucose (CEDROLA, 2004). Para validar os dados de viabilidade celular foram realizados ensaios de viabilidade celular através do método de cristal violeta (GILLIES, DIDIER e DENTON, 1986), que mede a quantidade de células aderidas, sendo mais fidedigno com a quantidade de células viáveis, pois a linhagem B16-F10, quando não viável, perde a adesão. Conforme mostra a Figura 10C, há uma diminuição na viabilidade em 24%, estando próximo ao valor encontrado no método de MTT (30 %), indicando que não houve grandes diferenças entre esses métodos, validando os dados de viabilidade celular.

Outra questão avaliada cuidadosamente foi a curva de proliferação. Novos ensaios de curva de proliferação através do método de MTT foram realizados, pois não haveria necessidade de desadesão das células por tripsina, uma vez que não era conhecida a resposta das células melanogênicas à tripsinização. Conforme mostra a Figura 10D, a curva de proliferação pelo método de MTT mostrou resultados similares à curva realizada por contagem de células.

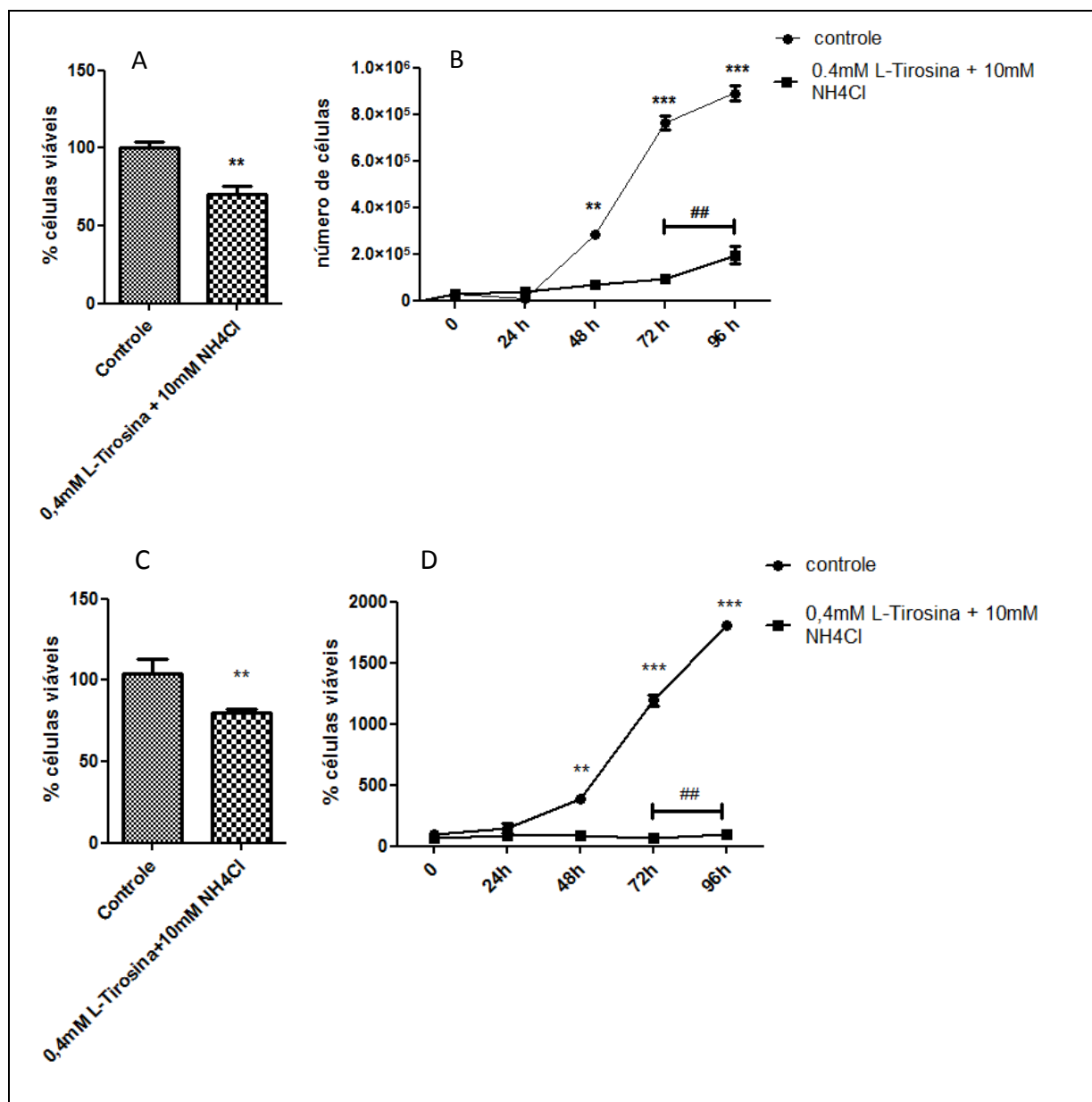


FIGURA 10 – EFEITOS DO ESTÍMULO DA MELANOGÊNESE SOBRE A VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR.

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: (A) O teste de viabilidade celular foi feito pelo Método MTT após 14 h a partir do fim do estímulo da melanogênese, ou seja, após 48 horas de estímulo (L-tirosina e NH<sub>4</sub>Cl), o meio de cultura foi trocado e as células foram mantidas por mais 14 horas com meio de cultura RPMI1640 sem estimulantes. No controle as células foram mantidas com meio RPMI1640 (B) A proliferação celular foi realizada através de contagem de células em Câmara de Neubauer, nos tempos indicados. As células estimuladas foram mantidas em meio contendo L-tirosina e NH<sub>4</sub>Cl por 48 h e depois mantidas por mais 48 h em meio sem estimulantes (C) O teste de viabilidade celular foi feito pelo Método Cristal Violeta nas mesmas condições descritas em A. (D) A proliferação celular foi realizada pelo método de MTT, nas mesmas condições descritas em C. Os dados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes (\*\*p < 0,05; \*\*\*p < 0,001 em comparação com os tempos correspondentes nos controles; ##p < 0,05 comparação dos tempos 72 e 96 horas das células estimuladas).

---

#### 6.1.4. Alterações no ciclo celular após estímulo da melanogênese

Estudos anteriores em melanócitos humanos mostraram que a melanogênese pode atrasar a progressão do ciclo celular inibindo o crescimento celular (HADDAD *et al.*, 1999). Portanto, com base nos resultados da curva de proliferação e para investigar possíveis alterações no ciclo celular resultantes da indução da melanogênese, a distribuição de células nas fases do ciclo foi analisada por citometria de fluxo.

Nesse experimento, as células tiveram seu DNA marcado com iodeto de propídio e através da fluorescência foi possível detectar a quantidade de células em cada fase do ciclo celular (WANG *et al.*, 2008). Como mostra a figura 11, o estímulo da melanogênese em células B16-F10 com L-tirosina e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  induziu parada no ciclo celular na fase G1. Os dados mostram diferenças na quantidade de células em cada fase do ciclo celular (figura 11C). Nas células controle, a população na fase G1 foi de aproximadamente 60%, enquanto as células estimuladas mostraram um aumento significativo nessa população, atingindo quase 70%. Os resultados da distribuição celular na fase G2-M aproximadamente 15% de células no grupo controle, e aproximadamente 3% para as células estimuladas. A fase sub-G1 não foi detectada e não houve diferença estatística na fase S. Resultados similares foram observados quando as análises foram realizadas após 14 horas da substituição do meio de cultura contendo estimulantes por um meio de cultura normal (dados não mostrados).

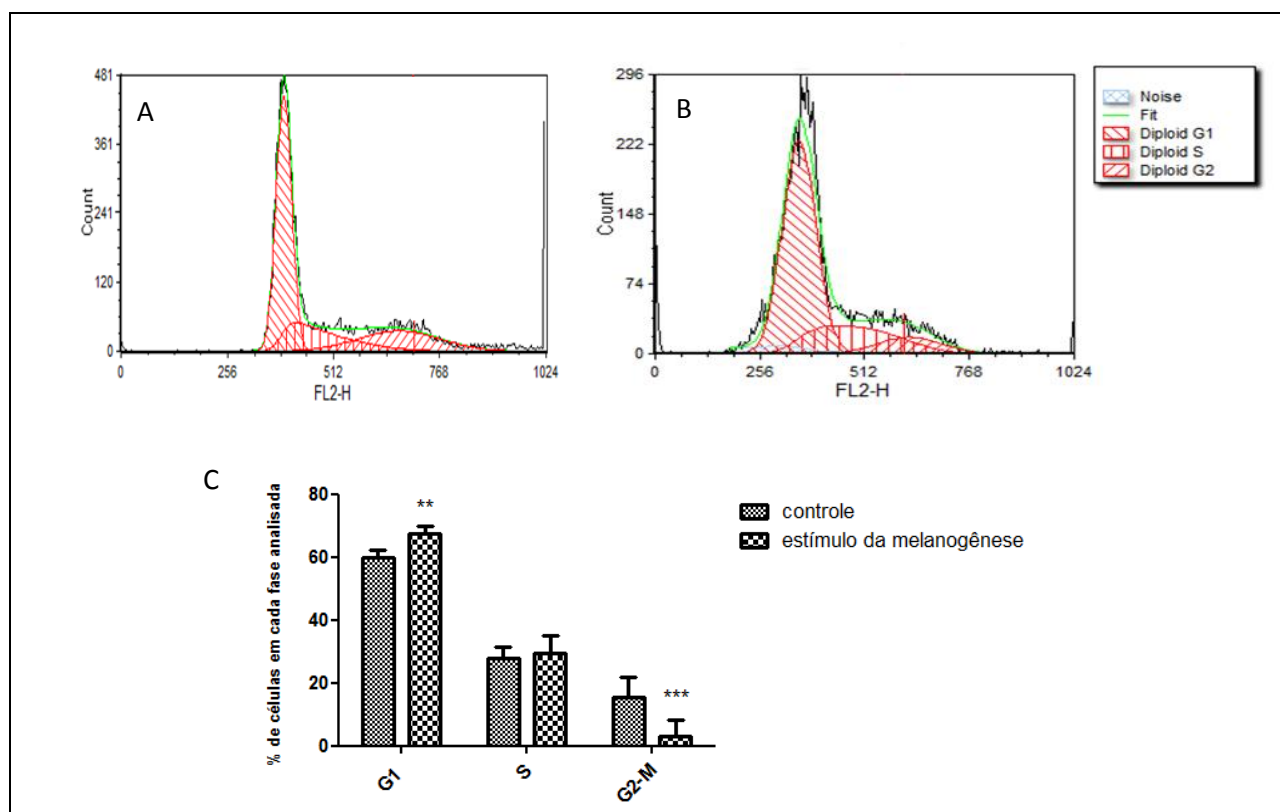


FIGURA 11 – ALTERAÇÕES NO CICLO CELULAR APÓS ESTÍMULO DA MELANOGÊNESE.

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: (A) Histogramas representativos da análise de citometria de fluxo da linhagem B16-F10 controle; (B) Histogramas representativos da análise de citometria de fluxo da linhagem B16-F10 com estímulo. Após 48 h de estímulo, as células foram coletadas, lavadas 2x com PBS, marcadas com 25µg/mL de iodeto de propídeo e analisadas no citômetro FACSCalibur, em filtro FL2, monitorado por 10.000 eventos. (C) Porcentagem de células em cada fase do ciclo celular após estímulo da melanogênese. Os dados foram analisados através do programa FCS Express 4 Flow Research. Os dados estão apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes (ANOVA \*\*p < 0,05; \*\*\*p < 0,001).

#### 6.1.5. Efeitos do estímulo da melanogênese sobre o processo de senescência celular

A fase G1 do ciclo celular é a fase de proliferação e síntese de proteínas quando as células são sensíveis ao microambiente, podendo permanecer nesta fase em condições desfavoráveis como queda no aporte nutricional (WARD, 2002). A regulação da fase G1 é feita em dois pontos, o primeiro ponto é o “restriction point” comandado por fatores de crescimento (ZETTERBERG A, 1995) e o segundo ponto é “cell growth checkpoint” conduzido por sinalizações relacionadas ao aporte nutricional (HO, 2002). Em algumas situações, como na senescência celular, há um desbalanço e esses pontos restringem a proliferação, especificamente na fase G1 (STEIN *et al.*, 1999).

Além disso, estudos mostraram uma correlação entre melanogênese e senescência (HADDAD *et al.*, 1999). Portanto, foi investigada uma possível promoção da senescência celular em células B16-F10 após estímulo da melanogênese com L-tirosina e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  usando o teste de  $\beta$ -galactosidase, que se apoia no fato de que na senescência celular há superexpressão e acúmulo da enzima beta-galactosidase nos lisossomos (DEBACQ-CHAINIAUX *et al.*, 2009). Os resultados desses experimentos estão apresentados na figura 12A e foram observadas poucas células marcadas para atividade de  $\beta$ -galactosidase para as condições controle e estímulo.

Além dos ensaios de beta-galactosidade, foram também realizados experimentos de RT-qPCR para quantificar os níveis de RNA mensageiro de importantes supressores de tumor e que podem estar relacionados com o processo de senescência celular (p19, p21, p27 e p53) (COLLADO e SERRANO, 2006).

Os resultados mostraram que o estímulo da melanogênese em células B16-F10 promovem uma diminuição significativa nos níveis de mRNA de p19 (2 vezes) e p27 (1,3 vezes), um aumento em p21 (1,5 vezes) e nenhuma alteração nos níveis de mRNA de p53 (figura 12B).

Apesar do aumento nos níveis de mRNA de p21 ser um indicativo de senescência celular, os dados dos outros genes (p19, p27 e p53) não sustentam um envolvimento de senescência, uma vez que o esperado para células senescentes seria um aumento nos níveis de p19, p27 e p53. Além disso, os resultados de beta-galactosidase, indicaram baixa atividade dessa enzima, corroborando para a conclusão de que a senescência celular não seria o mecanismo envolvido no acúmulo de células na fase G1 do ciclo neste estudo.

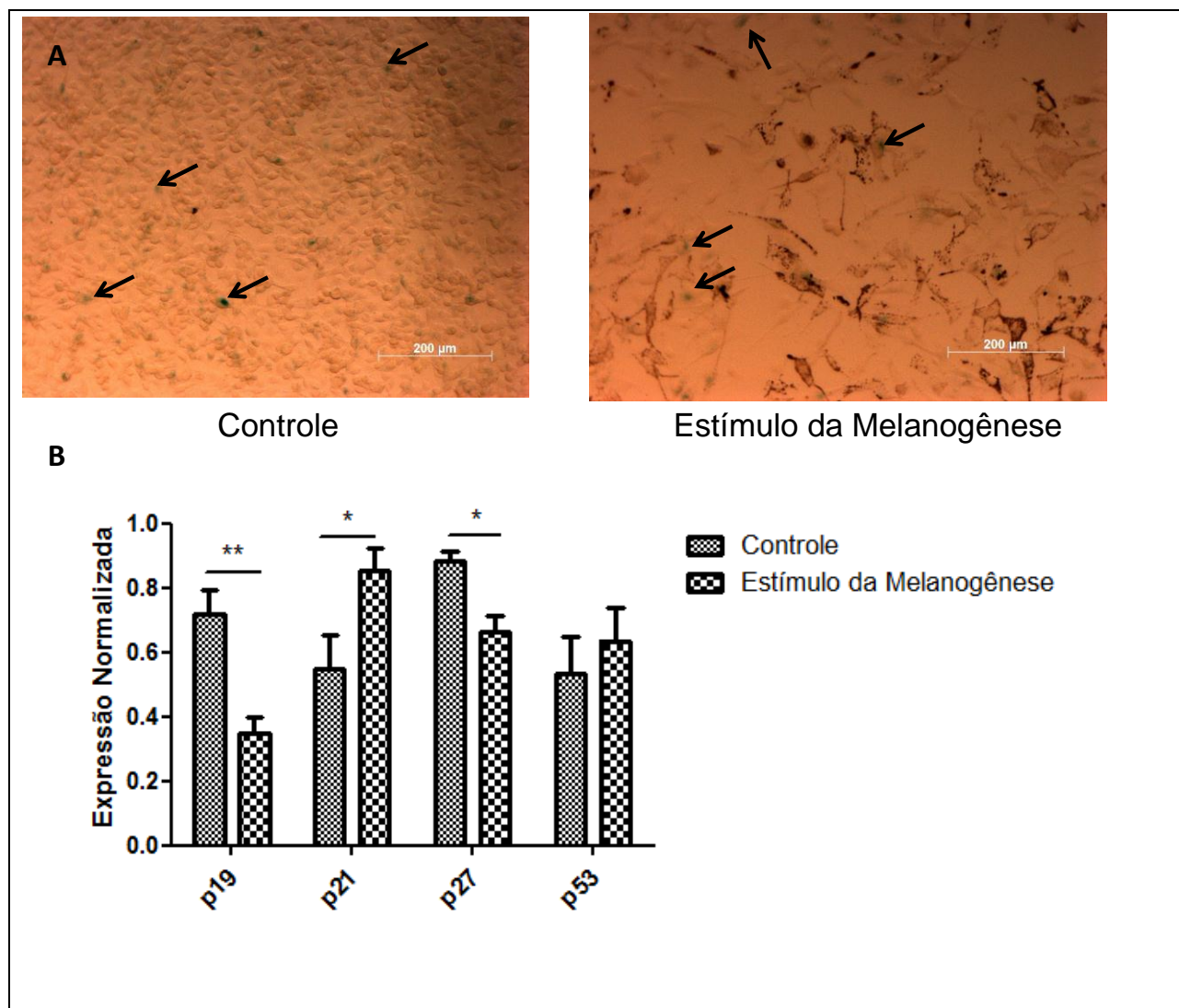


FIGURA 12 – EFEITOS DO ESTÍMULO DA MELANOGÊNESE SOBRE O PROCESSO DE SENESCÊNCIA CELULAR.

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: (A) Micrografias representativas das células B16-F10 controle (esquerda) e células estimuladas (direita). As células foram plaqueadas, estimuladas, coradas usando o kit de coloração para  $\beta$ -galactosidase e foram analisadas usando um microscópio óptico. As setas indicam células coradas para Beta-galactosidase; (B) Dados de RT-qPCR para os genes p19, p21, p27 e p53. Os resultados estão apresentados como uma expressão relativa de cada transcrito normalizados com os genes GAPDH e HPRT. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes (ANOVA \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ ).

#### 6.1.6. Indução de Quiescência celular após estímulo da melanogênese

Os resultados de ciclo celular e os dados de expressão dos supressores de tumor sugerem uma possível indução de estado quiescente, também conhecido como

---

fase G0 (PERUCCA *et al.*, 2009). Alguns estudos mostram que no estado de quiescência há um aumento de p21 e p27 (TIAN e QUARONI, 1999), mas no presente estudo houve uma diminuição nos níveis de RNA mensageiro de p27. No entanto já foi mostrado que pode haver uma compensação na expressão de p21 quando há ausência de p27 (TIAN e QUARONI, 1999; KWON *et al.*, 2002).

Para avaliar a presença de células quiescentes, foram realizados ensaios de fluorescência com os corantes *Hoechst* 33342 e *Pyronin Y*. O primeiro é exclusivo para o DNA, enquanto que o segundo reage com ambos, DNA e RNA. Na presença de *Hoechst*, a interação de *Pyronin Y* com DNA é bloqueada, e *Pyronin Y* cora somente RNA. Quando as células são marcadas primeiro com o *Hoechst* 33342 e então com *Pyronin Y*, é possível distinguir DNA de RNA. Sabe-se que células quiescentes, que estão paradas na fase G0 têm baixos níveis de RNA se comparadas com células ativas (fase G1) (SHAPIRO, 1981). Esse critério foi utilizado para estimar o número de células em quiescência.

Os resultados desse experimento estão apresentados na figura 13. Os resultados mostraram diminuição de RNA em células com a melanogênese estimulada (Figura 13A e 13B), que conjuntamente com os demais resultados, sugerem que em condição de estímulo da melanogênese, as células entram no estado de quiescência.



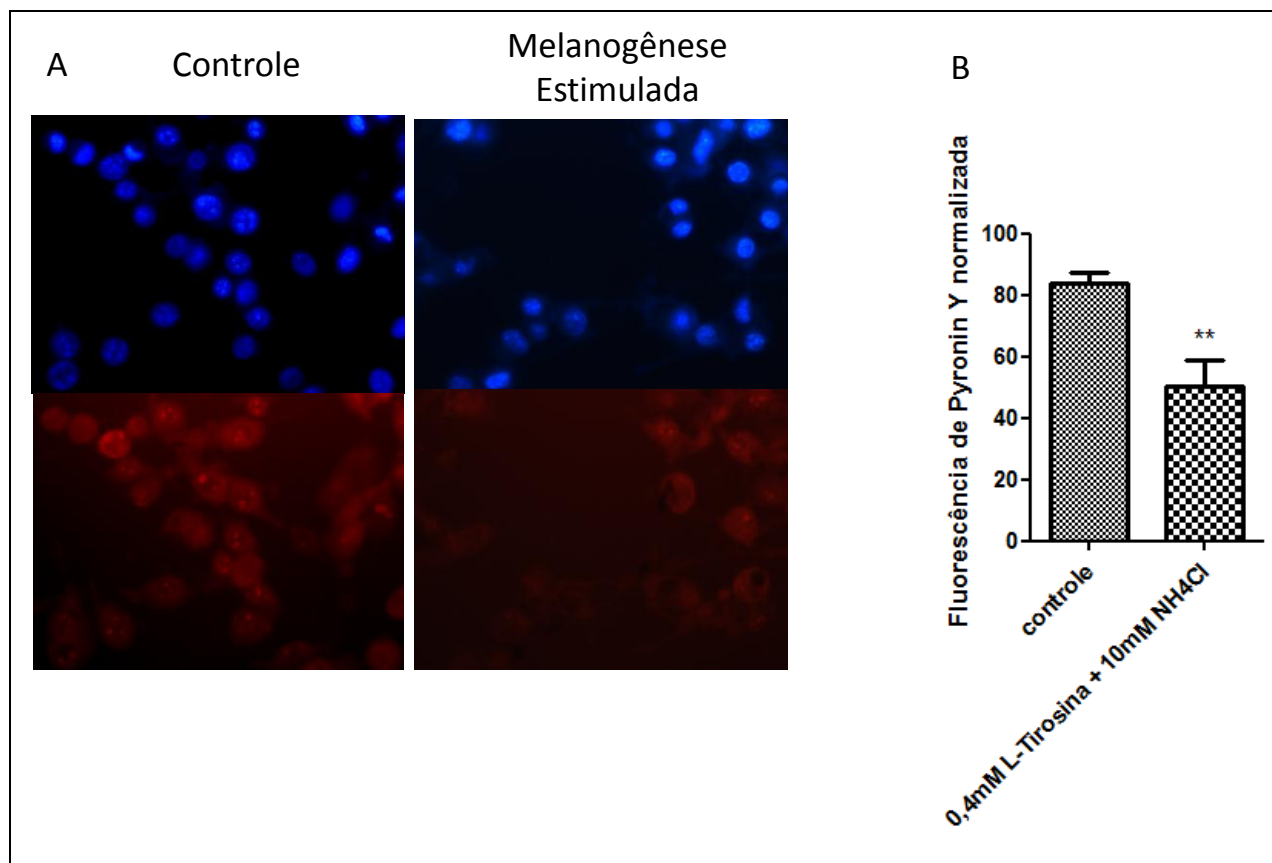


FIGURA 13 – INDUÇÃO DE QUIESCÊNCIA CELULAR APÓS ESTÍMULO DA MELANOGÊNESE

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: Após 48 h de estímulo, as células foram coletadas, lavadas duas vezes com PBS, coradas com 10µg/ml *Hoechst* 33342 por 45 minutos a 37°C. Após isso, 100µg/ml de *Pyronin Y* foi adicionado diretamente às células seguindo-se incubação por 10 minutos. (A) Marcação diferencial de DNA com *Hoechst* 33342 (excitação – UV, emissão 455 nm) vs RNA com *Pyronin Y* (excitação: 488 nm, emissão: 575 nm) em microscópio de fluorescência usando luz UV (painéis superiores) e luz verde (painéis inferiores). (B) Análises da fluorescência das células quiescentes após 48 h de indução da melanogênese na linhagem B16-F10. A fluorescência foi medida em um leitor de microplacas (TECAN Infinity) e a quantidade de RNA foi calculada como a porcentagem de redução da fluorescência (menos o background) em relação ao grupo controle. Os dados foram normalizados pelo número de células viáveis determinadas pelo método MTT. Os dados estão apresentados como a média ± desvio padrão de três experimentos independentes (\*\*p <0,05).

Com isso, pode-se considerar que o estímulo da melanogênese pode gerar uma cascata de sinalização que atinge os pontos de regulação do ciclo celular, gerando parada de ciclo em G1 e entrada em G0, com produção de populações de células quiescentes. Esse mecanismo pode ser eficiente como uma resistência das células produtoras de melanina ao estresse oxidativo gerado pela via da melanogênese, uma vez que TAO CHENG e colaboradores (2000) mostraram que células quiescentes são menos suscetíveis a indução de morte celular. De forma interessante, populações de células quiescentes já foram isoladas de melanoma melanóticos (ROESCH *et al.*, 2010).

#### 6.1.7. Análise Proteômica após estímulo da melanogênese

O termo proteoma corresponde “todas as proteínas expressas por um tecido ou genoma” e refere-se ao coletivo de todas as proteínas expressas em uma célula, tecido, ou organismo, incluindo polimorfismos, isoformas, e modificações pós-traducionais (GRAHAM, ELLIOTT e VAN EYK, 2005). O reconhecimento da importância estratégica do proteoma para uma maior compreensão bioquímica dos organismos e dos processos biológicos, aliado ao desenvolvimento de abordagens de estudo em conjunto de proteínas de uma amostra permitiu o surgimento da “proteômica”, que visa estudar também a estrutura, função e o controle dos sistemas biológicos para análise das várias propriedades das proteínas. (SALI *et al.*, 2003).

Para fornecer evidências de que a melanogênese pode gerar maiores alterações a nível molecular, foi realizado um abrangente estudo proteômico pois alguns estudos têm mostrado que mudanças na via da melanogênese podem gerar profundas alterações proteicas, tanto com o estímulo da melanogênese pela superexpressão do gene da tirosinase (LÜ *et al.*, 2010), ou com inibição da melanogênese pela ação do ácido kójico (NAWARAK *et al.*, 2008).

Uma caracterização proteômica requer métodos analíticos para detecção e quantificação das proteínas em suas formas modificadas e não modificadas. Isso pode ser atingido devido ao desenvolvimento e integração de quatro ferramentas: (1) o banco de dados, catálogo com dados de proteínas expressas anteriormente sequenciadas; (2) espectrometria de massas; (3) softwares que podem cruzar os dados da espectrometria de massa com sequências específicas no banco de dados; e (4) tecnologias simplificadas e eficientes de separação protéica (MARIO, 2005).

Na abordagem clássica da análise proteômica quantitativa, utiliza-se a eletroforese bidimensional (2-DE) para separação das proteínas e peptídeos, e a espectrometria de massas para identificação destes peptídeos (VERCAUTEREN, ARCKENS e QUIRION, 2007).

A 2-DE é usada para separação de misturas complexas de proteínas. A primeira dimensão da 2-DE é realizada em *strips*, que são tiras de géis de poliacrilamida fixas a tiras de plástico, contendo grupos básicos e ácidos fixados na malha do gel, formando

---

um gradiente de pH (IPG *strips*). Na segunda dimensão, as proteínas são separadas de acordo com sua massa molecular relativa, através de SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). O resultado final da 2-DE é um gel contendo *spots* de cadeias peptídicas (RABILLOUD *et al.*, 2010).

Neste trabalho, foi empregada a proteômica clássica (separação proteica por 2-DE e espectrometria de massas MALDI-TOF). As células B16-F10 foram estimuladas com L-tirosina e NH<sub>4</sub>Cl por 48 h e seguida pela substituição do meio de cultura contendo estimulantes por um meio de cultura comum, e incubação por mais 14 h. O homogenato celular foi então submetido à extração de proteínas e consequente separação proteica em 2-DE.

Para a análise quantitativa, após a obtenção das imagens das replicatas biológicas e, quando disponível, das replicatas técnicas dos géis de 2-DE, estas devem ser analisadas utilizando-se softwares específicos. Estes softwares detectam os *spots* e depois estabelecem correspondência entre os *spots* de diferentes géis a serem comparados (*matching*). Normalmente a porcentagem do volume (variável dada pela intensidade em pixels e área dos *spots*) é utilizada para identificar alterações na abundância de *spots* individuais entre diferentes grupos de géis.

Neste trabalho, após a coloração, a análise quantitativa foi realizada através do *software Platinum* (versão 6.0). A detecção dos *spots* no gel 2-DE iniciou-se selecionando uma pequena região do gel para ajuste dos parâmetros para a detecção dos *spots*: *smooth*, saliência e área mínima. Segundo as instruções do manual do *software Platinum* (versão 6.0), o parâmetro *smooth* fixa o número de vezes que o software irá homogeneizar a região selecionada antes de seguir a detecção e deve ser otimizado de forma a detectar *spots* reais. A Saliência é uma medida baseada na curvatura do *spot*. Através deste parâmetro é possível filtrar *spots* reais de artefatos da técnica e ruídos de fundo. Por fim, o parâmetro área mínima é utilizado para eliminar regiões menores que a indicada, possibilitando, também, que partículas presentes no gel com pixels muito escuros sejam eliminados.

Foi verificado por meio de várias tentativas, que com os parâmetros 2 para *smooth*, 40 para saliência e 2 para área mínima, a grande maioria dos *spots* podiam ser detectados automaticamente na região selecionada. Assim, estes parâmetros foram

estendidos para todo o gel através de uma ferramenta do software para a detecção automática.

Para comparar imagens entre pares de géis é preciso efetuar o processo de *matching*, ou seja, identificar quais *spots* são equivalentes entre estes pares. Primeiramente, buscou-se comparar os géis duplicatas, isto é, provenientes de amostras submetidas a uma mesma condição e corrida eletroforética. Antes de proceder com a detecção automática de *spots* equivalente (*matches*) entre os pares de géis, foi necessário definir manualmente *spots* que claramente estavam presentes nos dois géis, também chamados de *starting matches*. Esse procedimento auxilia o programa no alinhamento dos géis e comparação correta entre os *spots*. Os *spots* podem ser marcados também através de *landmarks* e a comparação entre os géis é iniciada por tais marcações.

Após realizar o *matching* das triplicatas controle (sem estímulo da melanogênese) e triplicatas com estímulo da melanogênese, foi feito um estudo de correlação entre os *spots* dos pares de géis para volume e intensidade normalizados, ou seja, volume relativo (%V) e intensidade relativa (%I), na qual se obteve uma boa correlação entre os pares de géis. Esse mesmo procedimento foi realizado para comparação das duas condições para fornecer dados sobre alterações geradas após o estímulo.

A Figura 14 mostra imagens representativas dos géis 2-DE de células B16-F10 controle e estimuladas. Aproximadamente 638 *spots* foram detectados na amostra controle, enquanto 421 *spots* foram detectados em amostras de células após estímulo da melanogênese, com nenhuma diferença significativa entre as triplicatas. Análises comparativas entre esses grupos detectaram 328 *spots* presentes nas duas condições (*matches*), sendo 33 *matches* com regulação aumentada e 28 (*matches*) com regulação diminuída, após estímulo da melanogênese. Adicionalmente, 310 *spots* foram detectados somente nas amostras controle, enquanto 93 *spots* presentes apenas após o estímulo da melanogênese. Esses dados estão simplificados na figura 15. Na figura 16, estão destacados *Spots* diferencialmente detectados nos géis 2-DE de células controle, que não estão presentes nos géis de células estimuladas.

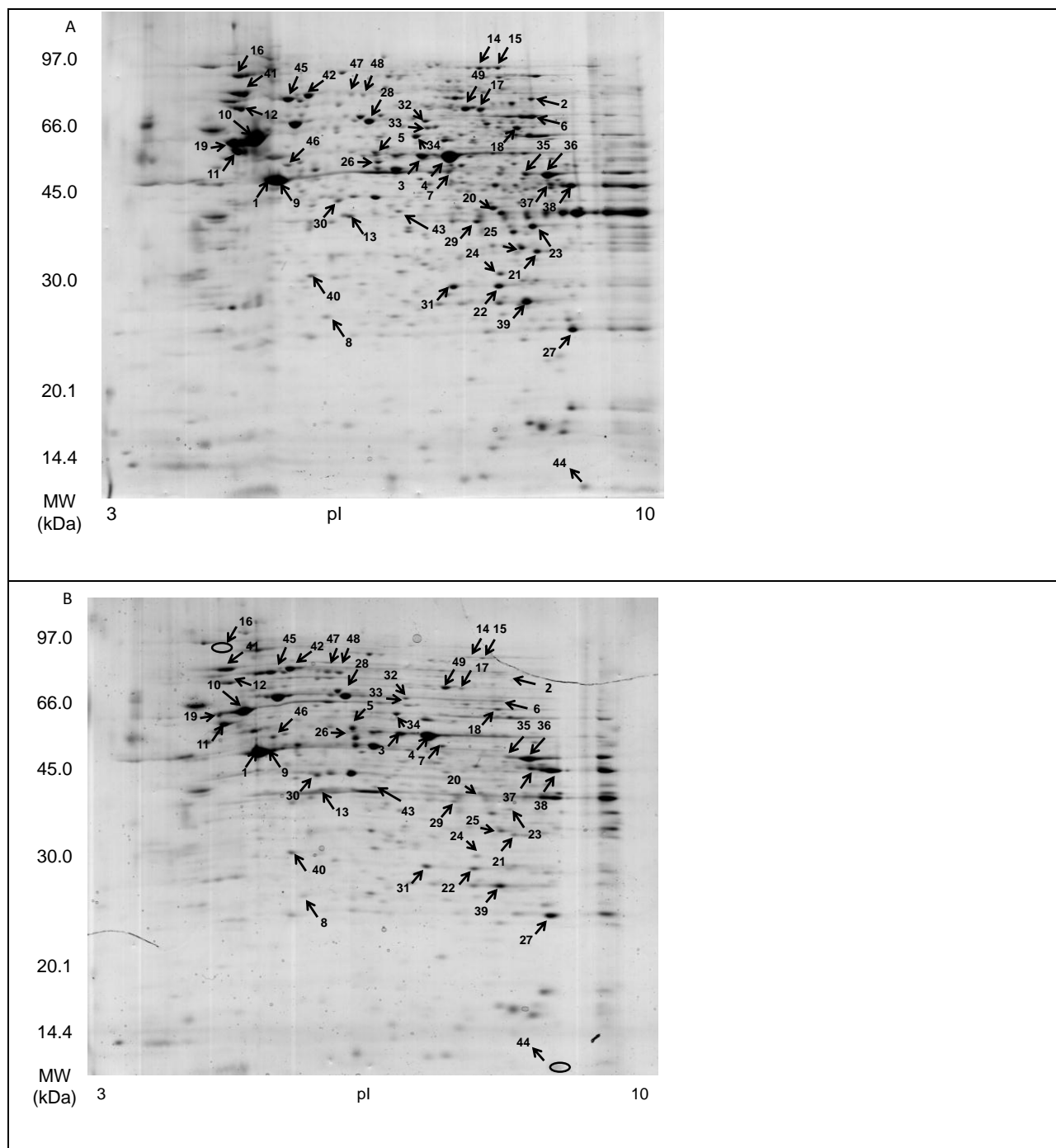


FIGURA 14 – ELETROFORESE BIDIMENSIONAL DE CÉLULAS B16-F10.

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: Gel 2-DE representativo de células controle. (A) Gel 2-DE representativo de células controle; (B) Gel 2-DE representativo de células mantidas por 14 horas em meio de cultura RPMi1640 após estímulo da melanogênese por 48 horas. Um total de 500 µg de proteína foi submetida a focalização isoelétrica usando tiras de pH 3 a 10 não-linear, seguidos por separação em gel 12,5% de poliácridamida (SDS-PAGE). Os Spots numerados indicam as proteínas identificadas por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF e estão listados na Tabela 2. Marcadores de peso molecular foram aplicados juntamente com as amostras mas não estão representados nas figuras.

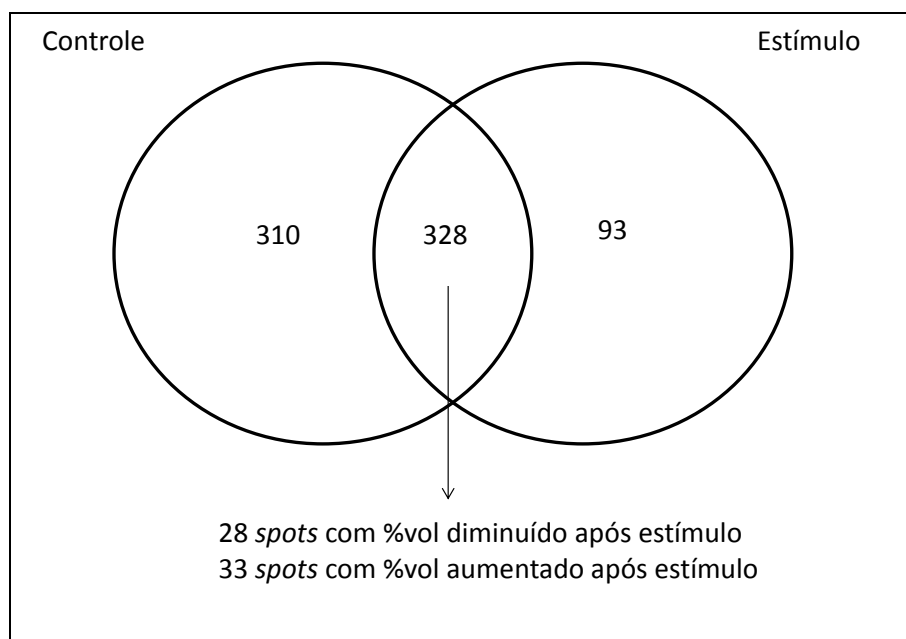


FIGURA 15 – DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE *SPOTS* DOS GÊIS REPRESENTADOS NA FIGURA 14.  
FONTE: O Autor (2012)

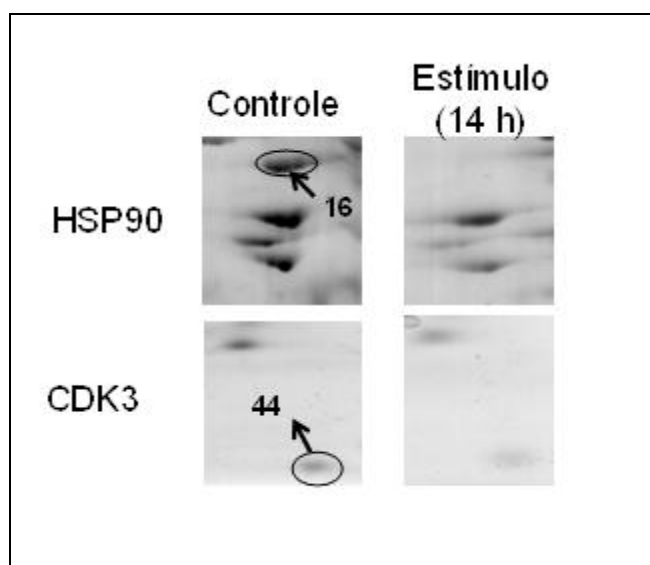


FIGURA 16 – *SPOTS* DIFERENCIAIS DETECTADOS APÓS ANÁLISES DE ELETROFORESE BIDIMENSIONAL.

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: *Spots* diferencialmente detectados nos géis 2-DE de células controle, que não estão presentes nos géis de células estimuladas.

Normalmente, a identificação dos *spots* com abundância significativamente alterada e outros *spots* de interesse é feita através de análises por espectrometria de massas. A identificação por análise de massas requer que os *spots* sejam recortados dos géis e fragmentados em peptídeos, normalmente pela ação da tripsina, que cliva a cadeia peptídica no lado C-terminal de lisina e arginina.

A espectrometria de massas mede com uma sensibilidade extremamente alta a razão entre a massa e a carga ( $m/z$ ) de íons na fase gasosa (BAHARVAND *et al.*, 2007). Os espectrômetros de massas consistem basicamente de uma fonte de ionização para produzir íons da amostra, um ou mais analisadores de massas, para separar os íons de acordo com a  $m/z$ , e um detector que registra o número de íons em cada valor de  $m/z$ . O desenvolvimento no final da década de 80 de duas técnicas de ionização, o MALDI (matrix assisted laser desorption ionisation) e o ESI (electrospray ionisation) permitiu que biomoléculas grandes e polares fossem transferidas para a fase gasosa para posterior análise de massas sem que ocorressem alterações nestas moléculas (LANE, 2005).

A fonte de ionização MALDI, utilizada neste trabalho, tem sido muito utilizada para a análise de *spots* obtidos por 2-DE devido a sua capacidade de analisar muitas amostras em um curto período de tempo, e por ser relativamente tolerante a contaminantes como sais (AEBERSOLD e GOODLETT, 2001). A ionização por MALDI requer que o peptídeo seja dissolvido em uma matriz com estrutura cristalina de pequenas moléculas que absorvem luz UV. A matriz absorve a luz UV no comprimento de onda do laser do MALDI e sublima. Como a matriz está em excesso em relação ao peptídeo esta absorve boa parte da energia do laser, e o peptídeo passa para a fase gasosa intacto (LANE, 2005).

Os analisadores comumente utilizados na proteômica são o íon trap (IT), time of flight (TOF), TOF-TOF, e híbridos como quadrupolo-TOF, IT/orbitrap, e IT/fourrier transform ion cyclotron (BACHI e BONALDI, 2008). A análise por TOF é baseada no princípio que todos os íons são acelerados com um mesmo potencial pela fonte de ionização, e como apresentam a mesma carga (+1) devem se deslocar em velocidades diferentes. Portanto, íons de massas diferentes irão levar tempos diferentes para se deslocar a uma mesma distância. A razão  $m/z$  é determinada pelo tempo que os íons

levam para percorrer uma região livre de campo elétrico e no vácuo, entre a fonte de geração do íon e o detector (tempo de voo). A resolução da  $m/z$  é afetada por variações no tempo de voo entre íons de mesma  $m/z$  (CHAURAND, LUETZENKIRCHEN e SPENGLER, 1999).

A grande maioria dos *spots* detectados nos géis deste trabalho foi analisada por espectrometria de massas sendo obtida identificação adequada de quarenta e nove *spots*. Dentre esses, 16 dos *spots* apresentam regulação aumentada e 31 regulação diminuída após o estímulo. O software utilizado para analisar os espectros provindos da espectrometria de massa foi o Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). Esse software possui a particularidade de trabalhar com um sistema de pontuação probabilística, cujo fundamento se encontra no cálculo da probabilidade de que um pareamento entre as sequências obtidas dos dados experimentais *peptide mass fingerprinting* (PMF) com as sequências *in silico* presentes base de dados seja dado ao acaso (AEBERSOLD e GOODLETT, 2001). Um pareamento significativo depende de uma baixa probabilidade do mesmo ocorrer ao acaso e do tamanho da base de dados. Considerando, por exemplo, uma base de dados de  $10^6$  sequências e uma probabilidade de um evento observado ocorrer ao acaso ser menor que um em vinte ( $p < 0,05$ ), a probabilidade de um pareamento significativo será aquele com valor menor que  $5 \times 10^{-8}$ . Tendo em vista que a probabilidade para bons pareamentos são em geral números muito pequenos, utiliza-se o valor transformado em score pela fórmula  $-10\log_{10}(P)$  em que P é a referida probabilidade de que o pareamento seja dado ao azar. Isso significa que o melhor pareamento é aquele com maior score, sendo em geral considerado significativo quando este é superior a 70 (PERKINS *et al.*, 1999).

O software permite trabalhar com diversos bancos de dados de diversas espécies. Os bancos de dados que estão disponíveis publicamente nos serviços MASCOT são: MSDB, NCBI, Swiss-Prot, EMBL EST divisions, contaminants e cRAP. Além disso, o programa permite selecionar parâmetros que serão levados em conta na busca da proteína. Por exemplo, parâmetros referentes a dados experimentais como enzima utilizada para digestão da amostra (a tripsina, por exemplo, cliva resíduos de arginina e lisina), tipo de espectrômetro utilizado, modificações fixas e variáveis em peptídeos. O software é configurado para tolerar a presença de várias modificações,



como aquelas ocasionadas pelo tratamento da amostra com agentes alquilantes (modificação fixa carbamidometilação) durante a pré-digestão da amostra, ou mesmo modificações variáveis de oxidação da metionina devido ao excesso de persulfato de amônia usado para polimerizar o gel (PERKINS *et al.*, 1999).

O banco de dados utilizado neste trabalho foi o NCBI, sendo que para a espécie em estudo, *mus musculus*, o valor do score considerado para que o pareamento seja significativo foi de 64 (valor dado pelo software Mascot). As proteínas identificadas estão descritas na tabela 2. Dentre as proteínas que tiveram diferença estatística ( $p < 0.05$ ) nos valores das médias das porcentagens de volume dos *spots*, são as seguintes: proibitina (+1.68x), receptor de proteínas kinase C ativado (RACK-1) (-1.64x), proteína de choque térmico 90 (HSP90) (*spot* diferencial – Figura 16) e quinase dependente de ciclina 3 (CDK3) (*spot* diferencial – Figura 16), que estão relacionadas ao ciclo celular (CARAGLIA e FABBROCINI, 1999; RASTOGI *et al.*, 2006; NECKERS, 2007; CHO *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2011); proteína dissulfeto isomerase A3 (PDIA3) (+3.25x), proteína de choque térmico 70 (HSP70) (+1.71x) e ornitina aminotransferase (OAT) (+1.91x) que estão relacionadas aos mecanismos de defesa celular (NOIVA e LENNARZ, 1992; MORIMOTO e SANTORO, 1998; LEI *et al.*, 2008); frutose bifosfato aldolase A (+2.09x), fosfolipase C-alfa (+1.70x), isocitrato desidrogenase 3 alfa (+1.94x) e lactato desidrogenase (LDH) (-3.20x) que estão relacionadas ao metabolismo e alterações tumorais (FANTIN, ST-PIERRE e LEDER, 2006; SUZUKI *et al.*, 2010; PRENSNER e CHINNAIYAN, 2011)

As proteínas que foram diferenciais, ou seja, que foram detectadas somente em uma das condições, neste caso, somente no controle, foram a HSP90 e CDK3, ambas relacionadas ao ciclo celular. A proteína HSP90 participa de um complexo de multi-chaperonas e algumas de suas proteínas-alvo fazem parte da sinalização do gene Ras que, por sua vez, está envolvido na proliferação celular, mas também em algumas etapas da apoptose (CARAGLIA e FABBROCINI, 1999; BANERJI, 2009). A CDK3 é uma proteína classificada com uma ciclina dependente de quinase, por ter a sequência quase idêntica à sequência da CDK2 (M MEYERSON, 1992) e por participar da progressão da fase G1 para a fase S, ao se ligar ao fator de transcrição E2F (BRAUN *et al.*, 1998). Em estudos com transfecção de dominante negativo de CDK3, houve

acúmulo de células na fase G1 (VAN DEN HEUVEL e HARLOW, 1993), o que corrobora com os resultados de ciclo celular anteriormente apresentados (Figura 11). Além disso, outros estudos mostraram que CDK3 tem outro substrato que é o c-jun, um componente do fator de transcrição AP-1, envolvido no desenvolvimento e proliferação de células tumorais (CHO *et al.*, 2009). CDK3 fosforila c-jun nas serinas 63/73 e com isso aumenta a atividade de AP-1, resultando em diminuição da proliferação celular (CHO *et al.*, 2009). Portanto, não detecção de CDK3 nas células de melanoma submetidas ao estímulo da melanogênese é concordante com a menor taxa de proliferação destas células (Figura 10). Ainda com relação às proteínas envolvidas no ciclo celular, a proibitina teve seus níveis aumentados e RACK-1 seus níveis diminuídos, esses dados também estão de acordo com os resultados de proliferação mostrados, pois proibitina é um potente supressor de tumor que age através da repressão do fator de transcrição E2F (RASTOGI *et al.*, 2006) e níveis diminuídos de RACK-1 estão relacionados com uma supressão na proliferação celular (WANG *et al.*, 2011).

O aumento da abundância dos *spots* das proteínas PDIA3, HSP70 and OAT indicam uma possível tentativa de recuperação celular. As proteínas PDIA3 são membros das GRP (proteínas reguladas por glucose) e catalizam isomerização de pontes dissulfeto intramoleculares, além de catalizarem dobramento protéico no retículo endoplasmático (NOIVA e LENNARZ, 1992). A chaperona HSP70 também participa do dobramento de proteínas, mas também participa na degradação de proteínas desnaturadas e modificadas por estressores como espécies reativas (MORIMOTO e SANTORO, 1998). Com essas informações, podemos supor que os níveis dessas proteínas aumentaram em resposta ao possível estresse gerado com o estímulo da melanogênese, pois as proteínas podem ter sido afetadas potencialmente pelo peróxido de hidrogênio produzido, ou mesmo pelo excesso de melanina produzido, uma vez que, a melanina pode agir como um radical (HILL e HILL, 1987). Já no caso da proteína OAT, possivelmente seus níveis aumentaram devido a presença do NH<sub>4</sub>Cl, pois OAT é uma enzima mitocondrial envolvida no metabolismo da ornitina (LEI *et al.*, 2008) e pode prevenir acúmulo de amônia (LIU, Y. *et al.*, 2008).

---

As proteínas com abundância dos *spots* alterada que estão envolvidas com o metabolismo serão discutidas a seguir juntamente com os resultados de RT-qPCR, pois estes foram essenciais para o entendimento de possíveis alterações metabólicas decorrentes do estímulo da melanogênese.

**Tabela 2.** PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS - MALDI-TOF APÓS ESTÍMULO DA MELANOGENESE

No <sup>(a)</sup>	Proteína <sup>(b)</sup>	cobertura % <sup>(c)</sup>	No. de peptídeos equivalentes	Número de acesso NCBI <sup>(d)</sup>	Massa/pl <sup>(e)</sup>	MASCOT Score <sup>(f)</sup>	Regulação após estímulo <sup>(g)</sup>
<b>Proteínas envolvidas com ciclo celular</b>							
14	Fator de alongamento 2 (EF2)	18	11	NP31933	96.222/6.41	123	-1.42
15	Fator de alongamento 2 (EF2)	16	12			103	+1.02
21	Receptor de proteína kinase C ativado (RACK-1)	47	11	AAG29506	33.502/7.61	143	-1.64*
16	Proteína de choque térmico 90 (HSP90)	28	19	NP32328	83.571/4.97	152	(h)
40	Proibitina	21	5	NP32857	29.859/5.57	93	+1.68*
44	Cyclin-dependent kinase 3, isoform CRA_a (CDK3)	29	4	EDL34565	14.646/8.78	76	(h)
<b>Proteínas envolvidas em mecanismos de recuperação celular</b>							
8	Chaperonina subunidade 8 (theta), isoforma CRA_c	21	6	EDK98339	15.041/5.19	122	+1.58
12	precursor de proteínas regulada por glucose 78-kDa (GRP78)	31	20	NP71705	72.492/5.07	180	+1.79
17	Proteína de choque térmico 60 (HSP60)	18	8	BAE39984	58.423/6.19	71	-1.49
26	Ornitina aminotransferase mitocondrial (OAT)	18	7	NP58674	48.723/6.19	103	+1.91*

No <sup>(a)</sup>	Proteína <sup>(b)</sup>	cobertura % <sup>(c)</sup>	No. de peptídeos equivalentes	Número de acesso NCBI <sup>(d)</sup>	Massa/pl <sup>(e)</sup>	MASCOT Score <sup>(f)</sup>	Regulação após estímulo <sup>(g)</sup>
27	Peroxirredoxina 1	53	11	CAM16506	19.086/6.82	150	+1.51
34	Chaperonina contendo TCP-1, subunidade beta	47	17	CAA83428	57.753/5.97	168	-1.03
41	Proteína de choque térmico 70 (HSP70)	17	8	BAE28883	56.972/5.43	97	+1.39
42	Proteína de choque térmico 70 (HSP70)	17	8			92	+1.71*
45	Chaperon complex, chain A	32	10	3CQX_A	42.431/6.69	113	+1.15
46	Asparaginase like 1	19	4	NP79886	34.385/7.56	74	+1.03
47	Proteína dissulfeto- isomerase A3 (PDIA3)	28	8	NP31978	57.099/5.88	145	+2.98
48	Proteína dissulfeto- isomerase A3 (PDIA3)	14	5			81	+3.25*
49	Fosfoproteína induzida por estresse 1	23	9	NP58017	63.170/6.4	95	+1.11
<b>Proteínas do citoesqueleto</b>							
1	Beta-actina	19	5	CAA27396	42.066/5.30	86	+1.92
2	Fator de <i>crosslinking</i> de microtubules de actina 1 (MACF1)	12	5	AAH43319	61.164/9.91	75	-1.73
9	Gama-actina	26	7	CAA31455	41.335/5.56	68	-1.07
10	Vimentina	36	9	CAA69019	51.590/4.96	132	-1.10
19	Tubulina cadeia beta-5	37	17	NP35785	50.095/4.78	178	-2.07
<b>Proteínas ligadas ao metabolismo celular</b>							
3	Enolase 1, cadeia alfa	44	15	NP1020559	47.453/6.37	139	+1.22
4	Enolase 1, cadeia alfa	26	9			152	+1.05
5	enolase alfa like isoform 3	33	8	XP3086456	38.765/5.55	75	+1.74

No <sup>(a)</sup>	Proteína <sup>(b)</sup>	cobertura % <sup>(c)</sup>	No. de peptídeos equivalentes	Número de acesso NCBI <sup>(d)</sup>	Massa/pi <sup>(e)</sup>	MASCOT Score <sup>(f)</sup>	Regulação após estímulo <sup>(g)</sup>
6	Piruvato Kinase, isoenzima M2 (PKM2)	41	14	NP35229	58.378/7.18	143	-2.59
11	ATP sintase subunidade beta, F1(ATP sintase)	33	11	ABD77233	48.047/4.90	128	+1.36
18	Succinil CoA: 3- cetoacida-coenzima A transferase 1	30	11	NP77150	56.352/8.73	101	+1.06
22	Fosfoglicerato mutase 1	40	7	NP75907	28.928/6.67	90	+1.06
23	Lactato desidrogenase (LDH)	33	11	AAH05509	34.823/8.18	137	-3.20*
24	S-metil-5'-tioadenosina fosforilase	31	5	NP77753	31.612/6.71	73	-1.17
25	Proteína de canal voltagem-dependente anion-seletiva 2	15	4	NP35825	32.340/7.44	76	-1.05
28	Fosfolipase C-alfa	29	12	AAA39944	39.944/5.98	106	+1.70*
30	Isocitrato desidrogenase 3 alfa	25	6	EDL25822	35.021/5.86	103	+1.94*
32	Glucose-6-fosfato 1- desidrogenase	31	15	NP32088	59.681/6.06	164	+1.14
33	D-3-fosfoglicerato desidrogenase	17	6	NP58662	57.347/6.12	98	-1.08
35	Fosfoglicerato kinase 1	38	10	NP32854	44.921/8.02	92	+1.33
36	Fosfoglicerato kinase 1	59	21			210	+1.11
37	Frutose-bifosfato aldolase A isoforma 2	31	7	NP31464	39.787/8.31	91	+2.09*
38	Frutose-bifosfato aldolase A isoforma 2	31	8			88	+1.47
39	Triosefosfato isomerase	41	8	P17751	27.038/6.90	103	+1.01

No <sup>(a)</sup>	Proteína <sup>(b)</sup>	cobertura % <sup>(c)</sup>	No. de peptídeos equivalentes	Número de acesso NCBI <sup>(d)</sup>	Massa/pl <sup>(e)</sup>	MASCOT Score <sup>(f)</sup>	Regulação após estímulo <sup>(g)</sup>
43	Proteína Aldolase redutase-related 2	26	8	NP32038	36.309/5.97	82	+1.00
<b>Outras funções</b>							
7	mCG15232, isoforma CRA_b	20	5	EDL26401	38.315/9.13	87	-1.30
13	60 proteína ácida ribossomal P0	29	7	NP31501	34.366/5.91	80	+1.67
20	Lipocortina I	50	17	AAA39437	38.952/6.56	210	-2.72
29	Beta catenina HEAT repeat, like	18	5	BAB24639	33.894/6.02	90	-1.07
31	Produto de proteínas não nomeada (i)	13	7	BAC33130	56.566/7.00	83	+1.05

<sup>(a)</sup>Números dos *spots* indicados na Figura 14. <sup>(b)</sup> Nome das proteínas de acordo com o banco de dados NCBI. <sup>(c)</sup> Cobertura da sequência das identificações por MS. <sup>(d)</sup> número de acesso no banco de dados NCBI. <sup>(e)</sup> Massa molecular/pl teóricos. <sup>(f)</sup> MASCOT *score*; o *score* nesse banco de dados para a espécie em estudo (*Mus musculus*) é considerado aceitável ( $p < 0,05$ ) quando o valor é maior que 64. <sup>(g)</sup> “+” e “-” indica aumento ou diminuição, respectivamente, na média dos volumes dos spots das células estimuladas em relação às células controle. (h) Proteínas difíceis de visualizar em géis após o estímulo da melanogênese. (i) proteínas desconhecidas, as quais as sequências foram analisadas pelo programa Motifscan e então classificadas; \* Proteínas com diferença estatística em relação ao controle,  $p < 0.05$  (Student's t-test).

#### 6.1.8. Efeitos do estímulo da melanogênese nos níveis de mRNA e na atividade da Lactato desidrogenase

Para melhor avaliar os resultados de proteômica, experimentos de RT-qPCR foram realizados para verificar se os níveis de RNA mensageiro eram correspondentes aos níveis de expressão de proteínas. Foram escolhidas proteínas importantes no metabolismo tumoral e melanogênese, mesmo não apresentando diferença estatística em relação ao controle.

OAT, HSP90, vimentina, PKM2 e ATP sintase foram proteínas escolhidas. Vimentina, PKM2 and ATP sintase tiveram seus níveis de RNA mensageiro concordantes com os dados de proteoma, enquanto OAT e HSP90 não mostraram correlação entre os níveis de RNA e de proteína (Figura 17A).

O controle dos níveis de HSP90 é necessário à sobrevivência celular pois essa proteína é fundamental para a recuperar a estabilidade e função de outras proteínas que participam de resistência a fatores antitumorais, replicação ilimitada, sustentação da angiogênese, invasão tecidual e metástase (POWERS e WORKMAN, 2006). Quando os níveis da proteína HSP90 são depletados, um fator de transcrição de *heat-shock* 1 (HSF1) é liberado e entra no núcleo para iniciar a transcrição de genes contendo elementos de *heat-shock* (HSE), forçando a síntese de HSP (NECKERS, 2007). Então, é possível sugerir que embora os níveis de HSP90 estivessem muito baixos nos experimentos de proteômica, já estaria ocorrendo uma sinalização para tradução de novas proteínas HSP90, mas como os experimentos de proteômica e RT-qPCR foram realizados no mesmo momento, não foi possível detectar a proteína. Para comprovar esta hipótese, o experimento de proteômica deveria ser realizado em tempos maiores.

A possível explicação para a diferença nos níveis de OAT pode estar relacionada a uma resposta tardia. Como essa proteína tem a função de prevenir o acúmulo de amônia, a sua regulação protéica aumentada foi necessária durante o estímulo da melanogênese, porém decorrido o tempo de estímulo e com a retirada do meio de cultura contendo  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , a ação desta enzima tornou-se desnecessária o que pode haver desencadeado uma sinalização para diminuir sua expressão. Como no caso da



HSP90, uma análise proteômica em maior tempo evidenciaria uma menor expressão dessa proteína.

A proteína vimentina teve suas alterações proteicas em acordo com os níveis de RNA mensageiro. Essa proteína é um filamento intermediário do citoesqueleto que tem funções como participar da migração celular, além de regular proteínas de resposta ao estresse (WANG e STAMENOVIC, 2002). Alterações nos níveis de vimentina podem ser resultantes de situações como o estresse oxidativo (PARON *et al.*, 2004). Estudos anteriores mostraram que a vimentina pode estar envolvida em apoptose pois é clivada por algumas caspases, além disso ela sequestra a proteína p53, formando um complexo, contribuindo para a resistência de tumores à apoptose (KLOTZSCHE *et al.*, 1998; PRASAD *et al.*, 1999; SHEIKH e FORNACE, 2000; YANG *et al.*, 2005). Portanto, os dados de 2-DE e de RT-qPCR mostram que as alterações na proteína vimentina pode estar colaborando para a supressão da proliferação celular.

Os níveis elevados de ATP sintase juntamente com os níveis diminuídos de PKM2 mostram que a melanogênese pode atuar diretamente ou ter consequências direitas sobre o metabolismo oxidativo, pois estudos com inibição da melanogênese mostraram exatamente o efeito oposto sobre os níveis dessas proteínas (NAWARAK *et al.*, 2008).

Além disso, os resultados de PKM2 (níveis de RNA mensageiro diminuídos) juntamente com os dados proteômicos de aumento do volume do *spot* da Frutose bifosfato aldolase A mostram uma possível mudança no metabolismo da glucose. A proteína piruvato quinase que catalisa a última reação irreversível da via glicolítica e é um dos pontos de regulação da via, geralmente está alterada durante a tumorigênese (CHRISTOFK *et al.*, 2008). Esta inibição de PKM2 promoveria um aumento dos produtos das reações precedentes, que pode ser ainda pronunciado devido ao aumento da aldolase. Entre os produtos acumulados, o gliceraldeído 3-fosfato poderia ser desviado para a via das Pentoses Fosfato na qual NADPH é produzido. Essa coenzima é extremamente necessária na condição de estímulo da melanogênese, pois é utilizada nas reações das enzimas antioxidantes (PERL *et al.*, 2011), requeridas em resposta ao estresse gerado pela melanogênese.

O aumento da ATP sintase e a diminuição de PKM2 sugerem o comprometimento da via de oxidação da glucose. Somado a isto, os níveis de LDH parecem diminuídos em resposta ao estímulo da melanogênese. Desta forma, tornou-se importante avaliar a atividade desta desidrogenase.

Os resultados destes ensaios (Figura 17B) evidenciam uma diminuição na atividade de LDH, sugerindo que a indução da melanogênese compromete o processo de glicólise anaeróbica. Esta diminuição é compatível com o aumento de ATP sintase visando aumento da fosforilação oxidativa como tentativa de obter energia.

Essa enzima tem uma função importante na manutenção de células tumorais, sendo conhecida como um biomarcador de prognóstico em melanoma. Segundo a American Joint Committee on Cancer (AJCC), altos níveis de LDH no soro é um fator de mal prognóstico, indicando estágio tardio de melanoma maligno, isto é, estágio de metástase e baixa sobrevida (BALCH *et al.*, 2009). Níveis aumentados de LDH dentro da célula tumoral estão relacionados com hipóxia celular, a qual ativa mecanismos compensatórios de produção de ATP via conversão de glucose em lactato (AGARWALA *et al.*, 2009), e baixa regulação ou inibição, estimula a respiração mitocondrial com consequente diminuição da tumorigênese (FANTIN, ST-PIERRE e LEDER, 2006).

Esses resultados possibilitam evidenciar clara alteração no metabolismo da célula tumoral quando está sob estímulo da melanogênese, o que estimula ainda mais a busca por respostas e outros testes para esclarecer o papel controverso da melanina nas células.

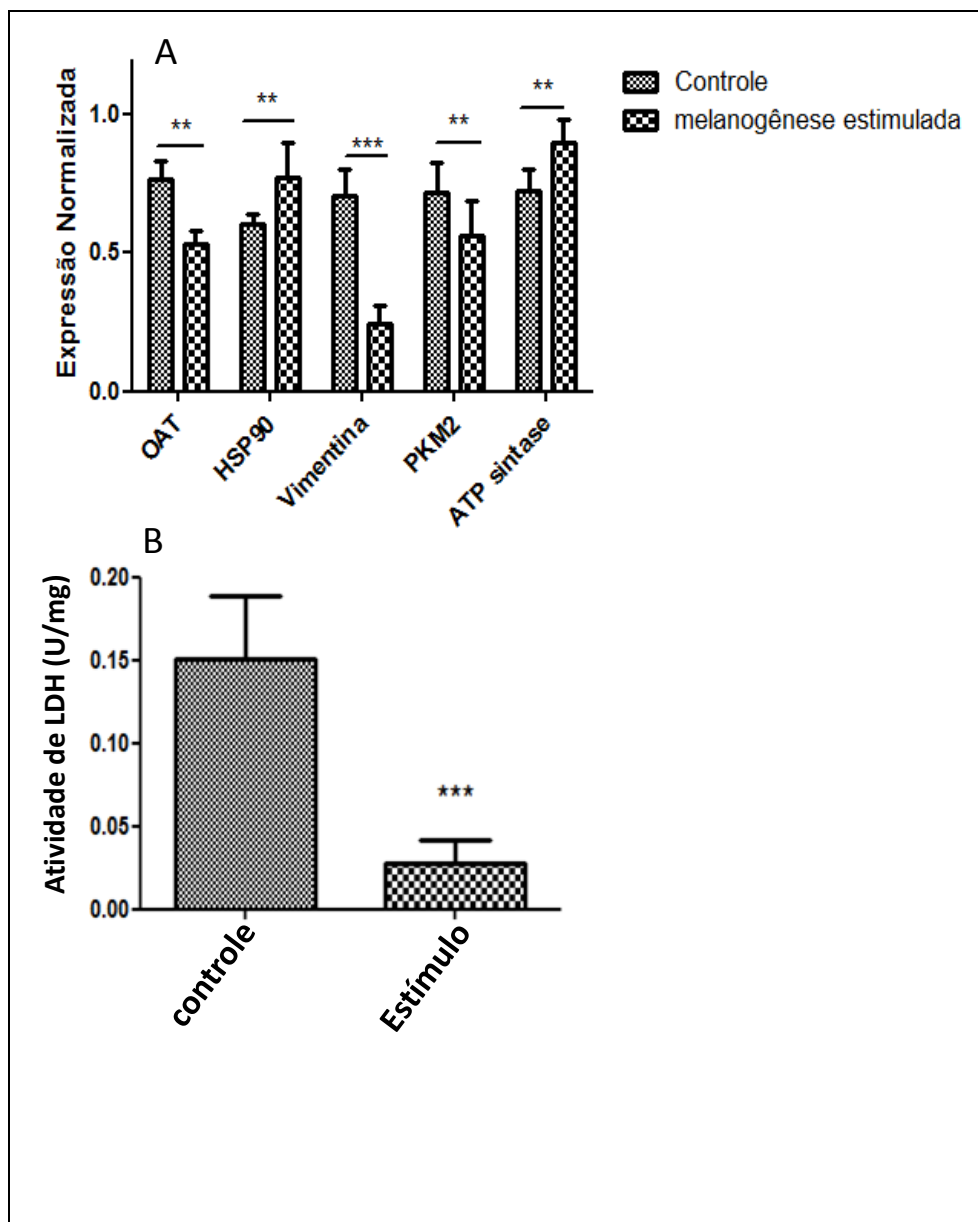


FIGURA 17 – EFEITOS DO ESTÍMULO DA MELANOGÊNESE NOS NÍVEIS DE mRNA e NA ATIVIDADE DA LACTATO DESIDROGENASE

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: (A) Dados de RT-qPCR dos genes OAT, HSP90, Vimentina, PKM2 e ATP sintase. Os resultados estão apresentados como expressão relativa de cada transcrito normalizada pelos genes de GAPDH e HPRT. Os dados estão apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes (ANOVA \*\*p < 0,05; \*\*\*p < 0,001). (B) Atividade específica (U/mg) de LDH medida pelo consumo de NADH. As células foram coletadas após 48 h de indução da melanogênese e foram incubadas a 37°C com 0,1 M de tampão fosfato (pH 7,4) contendo 1,2 mM de piruvato e 3 mM de NADH. Os dados estão apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes e os resultados foram normalizados pela quantidade de proteína (test-t \*\*\*p < 0,001).

Estudos anteriores com depleção de glucose no meio de cultura em células de melanoma murino BL6T mostraram uma diminuição significativa na proliferação celular,

com um aumento na porcentagem de células em G0 e G1, nenhuma alteração na fase S e diminuição (a quase zero) na quantidade de células em G2-M (CEDROLA, 2004). Esses dados estão em acordo, com os dados apresentados nas análises de ciclo celular, mostrando que os resultados de proteínas do metabolismo corroboram para o perfil celular visto com o estímulo da melanogênese, uma vez que, mostrou uma diminuição no metabolismo na glucose, indicando que no estado G0, as células apresentam baixas taxas metabólicas.

## 6.2. EFEITOS DO TRATAMENTO COM DHPNO<sub>2</sub> EM LINHAGENS DE MELANÓCITO (MELAN-A) E MELANOMA MURINO B16-F10

### 6.2.1. Síntese do endoperóxido

A síntese do endoperóxido DHPNO<sub>2</sub> representa uma etapa importante, pois este composto é utilizado como fonte limpa de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> nos experimentos. A concentração do endoperóxido foi determinada para cada uma das alíquotas obtidas após a filtração final. Foram obtidas soluções de concentração entre 170 a 190 mmol/L com pureza em torno de 84%. Este valor de pureza se refere à quantidade de DHPNO<sub>2</sub> obtido em relação ao total (DHPNO<sub>2</sub>+DHPN). Esses valores são adequados para utilização conforme anteriormente descrito (DEWILDE *et al.*, 1996; MARTINEZ *et al.*, 2000; PIERLOT, 2000; PIERLOT *et al.*, 2000).

### 6.2.2. Efeitos do tratamento com DHPNO<sub>2</sub> sobre a viabilidade celular

Para avaliar se o tratamento com DHPNO<sub>2</sub> poderia exercer o mesmo efeito tóxico nas células Melan-a e B16-F10, a morte celular foi avaliada usando teste de MTT (REILLY *et al.*, 1998). Para alcançar esse objetivo, a quantidade de células viáveis foi avaliada 14 e 36 h após o tratamento com o endoperóxido. As células foram tratadas com meio RPMI sem soro contendo 10 mM de DHPNO<sub>2</sub> por 2 horas. Nos ensaios controle, as células foram tratadas com 10 mM de DHPN (decomposto do DHPNO<sub>2</sub> usado no tratamento) pelo mesmo tempo. Após esse período, foi realizada a troca do

meio com tratamento pelo meio de cultura normal, que ficou 14 ou 36 h, antes da análise. Como mostra a figura 18, não foi observada diferença significativa na porcentagem de células viáveis da linhagem Melan-a e, ao contrário, nas células de melanoma, observa-se uma diminuição em aproximadamente 25% na porcentagem de células viáveis após 14 h do fim do tratamento, e em torno de 40% após 36 h.

Estes resultados estão em acordo com o estudo de Lebedeva e colaboradores (2007), no qual demonstrou-se que o  $^1\text{O}_2$  causa maior diminuição na viabilidade de células de câncer de próstata quando comparada com células normais, sugerindo uma seletividade para células tumorigênicas. Com isso, sugere-se que a linhagem Melan-a pode ser mais resistente ao tratamento com endoperóxido em comparação a células B16-F10.

Em relação à linhagem de melanoma, a maior toxicidade do  $^1\text{O}_2$  está de acordo com estudos anteriores, nos quais se demonstrou viabilidade celular diminuída de células de carcinoma escamoso submetidas à PDT com fotossensibilizador ácido metil aminolevulínico (MILLA *et al.*, 2011) e de células de melanoma murino com o fotossensibilizador azul de metileno (CHEN *et al.*, 2008).

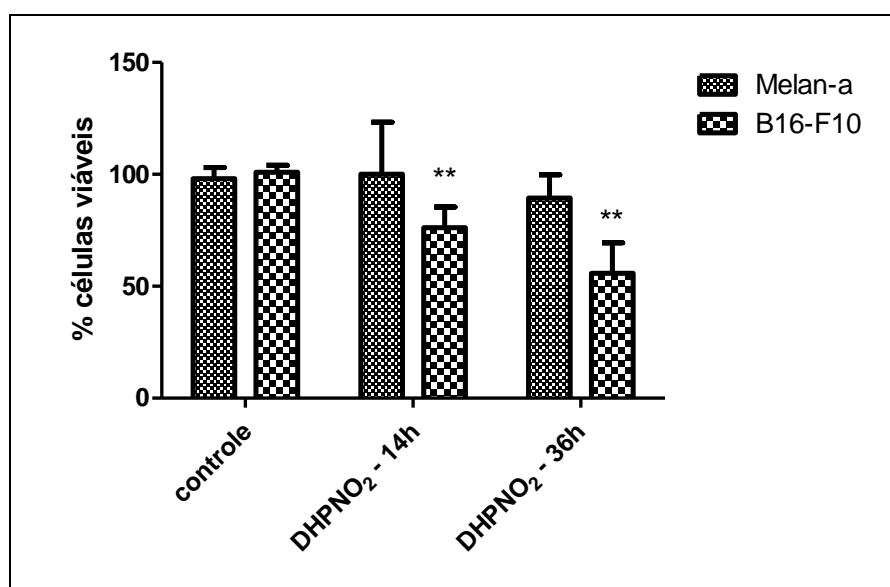


FIGURA 18 – VIABILIDADE CELULAR APÓS TRATAMENTO COM DHPNO<sub>2</sub>

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: (A) O teste de viabilidade celular foi feito pelo Método MTT após 14 h e 36 h a partir do fim do tratamento com DHPNO<sub>2</sub>. Nesses ensaios o controle utilizado foi 10 mM de DHPN e o tratamento foi realizado com 10 mM de DHPNO<sub>2</sub> por 2 h. Os dados estão apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes (ANOVA \*\*p < 0,05 em relação ao controle da mesma linhagem).

Portanto, para entender alguns dos mecanismos celulares que estariam ocorrendo frente ao tratamento com oxigênio singlete, análises proteômicas foram realizadas para a obtenção de dados mais abrangentes a cerca desses mecanismos.

### 6.2.3. Análises Proteômicas após tratamento com DHPNO<sub>2</sub>

A importância da análise proteômica em oncologia já foi demonstrada em estudos dos mecanismos da progressão do melanoma, bem como, na detecção de biomarcadores tumorais (DE SOUZA *et al.*, 2006). As diversas linhagens de melanoma, tanto humanas, quanto murinas, têm sido utilizadas em estudos proteômicos na última década com ganhos na descrição de proteínas fundamentais no processo de carcinogênese.

Em estudo utilizando 2-DE e espectrometria de massas (MALDI-TOF-MS), foi demonstrado que o fator de crescimento derivado de hepatoma (HDGF), nucleofosmina B23, quinolinato fosforibosiltransferase, catepsina D e proteínas da família 14-3-3 têm correlação com a progressão do melanoma (BERNARD *et al.*, 2003). Essa mesma metodologia mostrou ser efetiva para a identificação de proteínas associadas com o desenvolvimento de resistência a drogas em linhagens celulares de melanoma, incluindo entre as proteínas identificadas, a aldolase, GTP:AMP fosfotransferase e nicotinamida N-metiltransferase (SINHA *et al.*, 2003).

Usando proteômica, houve um enriquecimento sobre o conhecimento do perfil protéico nas diversas fases do melanoma, como exemplo, foi descrita a redução de proteínas responsáveis pela degradação de espécies reativas de oxigênio durante a progressão do melanoma murino (DE SOUZA *et al.*, 2006). Também usando melanoma murino em análises de crescimento tumoral, foi observado que durante o processo de carcinogênese, há um aumento na expressão de proteínas envolvidas na glicólise, na inflamação, no metabolismo do superóxido e em quimiotaxia, ao passo que, proteínas envolvidas na transmissão de impulsos elétricos, em dobramentos protéicos, coagulação sanguínea e transportes estão com a expressão diminuída (CULP *et al.*, 2006).

Além disso, em estudos realizados para avaliar mudanças proteicas sob estresse oxidativo, mostrou-se que as mudanças geradas por oxidação na cadeia polipeptídica e cadeias laterais de aminoácidos podem induzir extensas alterações químicas nas proteínas oxidadas, e que estas costumam ser irreversíveis, gerando inativação, degradação e até depuração da proteína (DAVID, 2006).

A oxidação de resíduos de aminoácidos aromáticos pode mudar a hidrofobicidade resultando em alterações na estrutura proteica. Uma vez que alguns dos produtos de oxidação são estáveis, eles têm sido utilizados como biomarcadores de oxidação proteica (DAVIES, 2005). Os aminoácidos lisina, arginina, prolina e treonina podem ser convertidos a grupos aldeídos e cetona (carbonilação) causando inativação, *crosslinking* e desarranjo proteico após oxidação (DALLE-DONNE *et al.*, 2003). Os aminoácidos cisteína e metionina são muito susceptíveis à oxidação, sendo que a cisteína pode formar dissulfetos com outras cisteínas ou com a GSH (BISWAS, CHIDA e RAHMAN, 2006). Essa glutationilação protege temporariamente cisteínas chaves contra completa oxidação, sendo que após isso há regeneração completa da GSH e da cisteína (DALLE-DONNE *et al.*, 2003).

Vários estudos mostram que alterações proteicas são comuns em tratamento com  $^1\text{O}_2$ , sendo que seus efeitos podem desencadear profundas alterações celulares (MAGI *et al.*, 2004; MORGAN, DEAN e DAVIES, 2004; CHEN *et al.*, 2008; JENSEN *et al.*, 2011). Portanto, para fornecer evidências de que o  $^1\text{O}_2$  pode gerar alterações ao nível molecular e buscar mais evidências de alterações proteicas, foi executado o estudo do proteoma nas linhagens Melan-a e B16-F10 após o tratamento com  $^1\text{O}_2$  gerado pela termodecomposição do DHPNO<sub>2</sub>.

Para isso, as células Melan-a e B16-F10 foram tratadas por 2 horas com 10 mM de DHPNO<sub>2</sub> e depois foram incubadas por 14 horas com meio de cultura normal sem DHPNO<sub>2</sub>. As células controle foram tratadas com 10 mM de DHPN (decomposto do DHPNO<sub>2</sub> usado no tratamento). O homogenato celular foi então analisado usando 2-DE. Após a coloração por Coomassie Blue, os géis foram analisados através do Software *Platinum* (versão 6.0). As Figuras 19A e 19B mostram imagens representativas dos géis 2-DE de células Melan-a controle e tratadas. Aproximadamente 236 *spots* foram detectados na amostra controle, enquanto 153 *spots*

foram detectados em amostras de células após tratamento com endoperóxido. Análises comparativas entre esses grupos detectaram 102 *spots* presentes nas duas condições (*matches*), sendo 9 *matches* com regulação aumentada e 18 (*matches*) com regulação diminuída, após tratamento. Adicionalmente, 134 *spots* foram detectados somente nas amostras controle, enquanto 51 *spots* presentes apenas após o tratamento. Esses dados estão simplificados na figura 20.



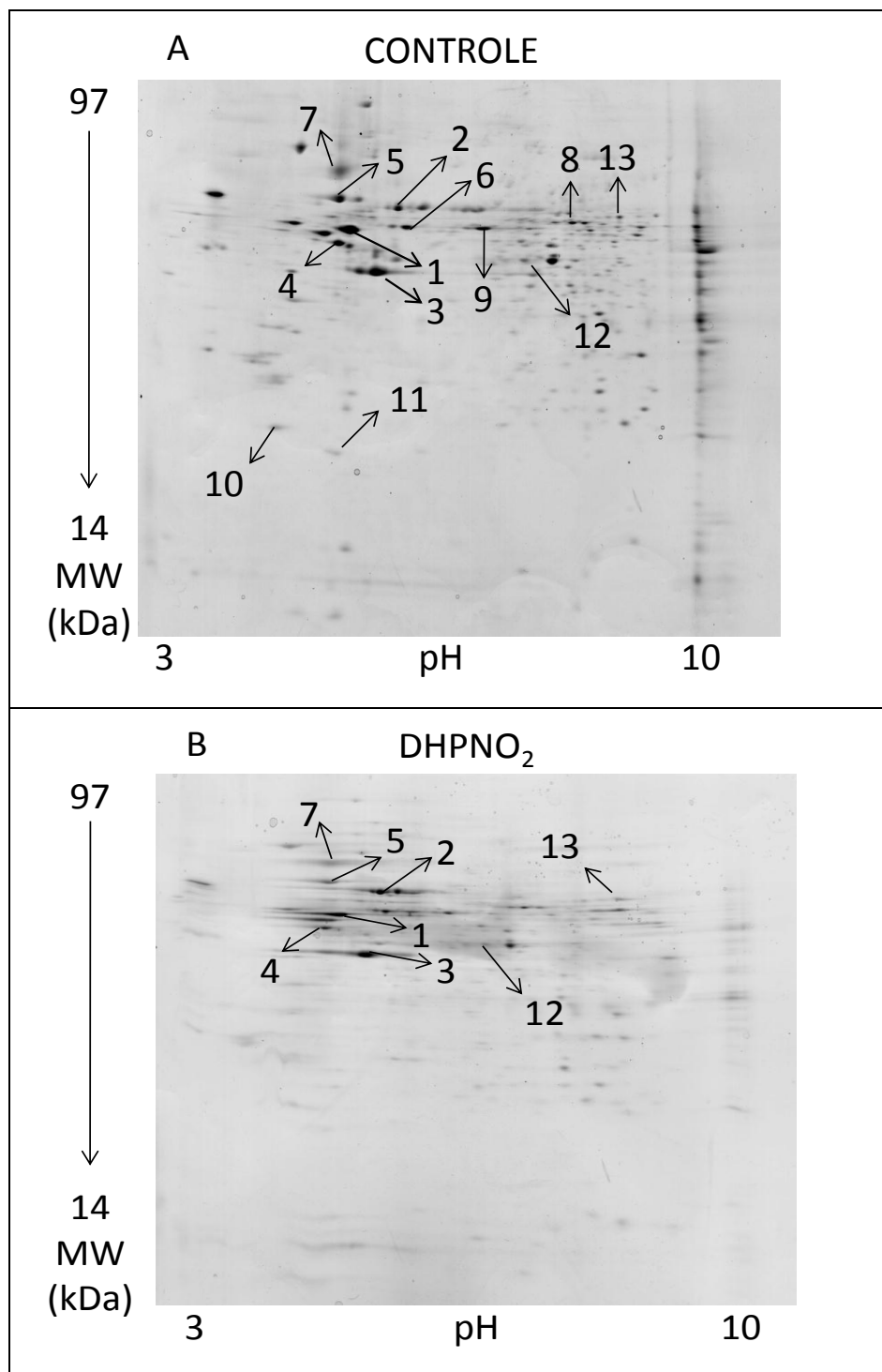


FIGURA 19 – ELETROFORESE BIDIMENSIONAL DA LINHAGEM MELAN-A APÓS TRATAMENTO COM DHPNO<sub>2</sub>

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: (A) Gel 2-DE representativo de células controle (10 mM de DHPN). (B) Gel 2-DE representativo de células após tratamento com 10 mM de DHPNO<sub>2</sub> por 2 horas. Um total de 500 µg de proteína foi submetida à focalização isoeletrica usando tiras de pH 3 a 10 não-linear, seguidos por separação em gel 12,5% de poliacrilamida (SDS-PAGE). As setas indicam as proteínas identificadas por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF e estão listados na Tabela 3.

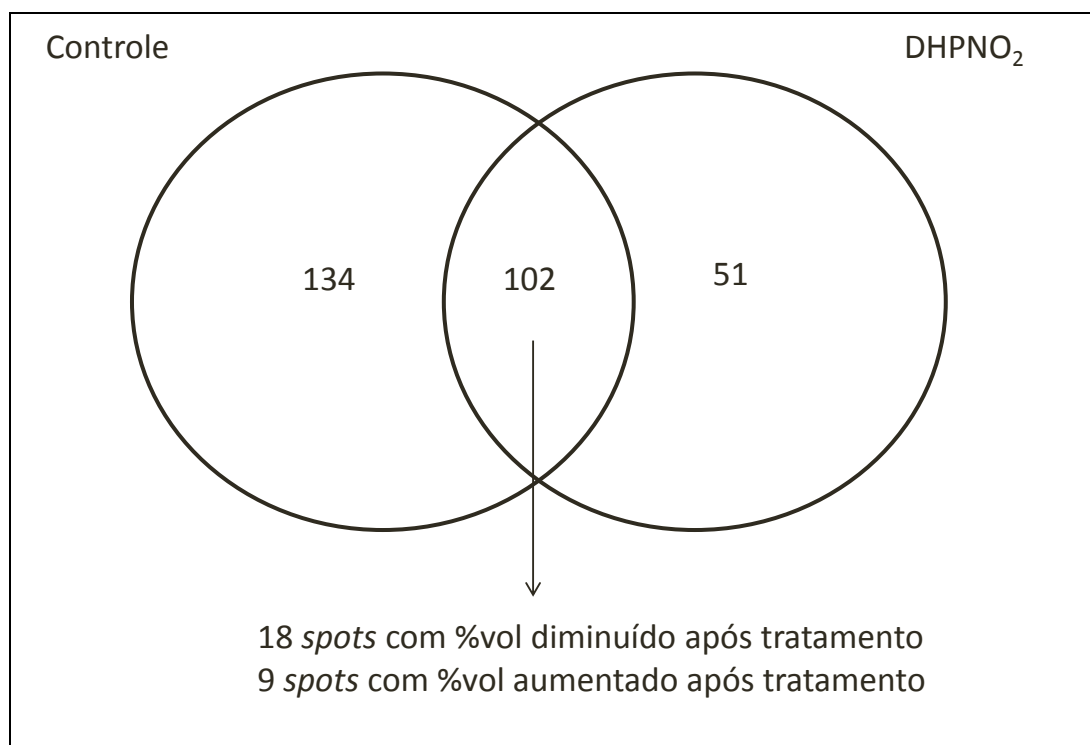


FIGURA 20 – DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE SPOTS DOS GÉIS REPRESENTADOS NA FIGURA 19A E B.

FONTE: O Autor (2012)

O número de *spots* detectados nos géis com Melan-a foram inferiores ao esperado, provavelmente por um problema na etapa de separação proteica. Na etapa de focalização isoeletrica, além do acúmulo final de 28000 Vhr (CULP *et al.*, 2006) na etapa final do processo, foi também testado acúmulo de 72000Vhr (DE SOUZA *et al.*, 2006). Porém, em ambos os protocolos, o número de *spots* foi baixo. Mesmo assim, seguiu-se com a identificação dos *spots* presentes.

As proteínas identificadas por espectrometria de massas estão descritas na tabela 3. Dentre as proteínas que tiveram diferença nos valores das médias das porcentagens de volume dos *spots* (acima de 2x) são as seguintes: vimentina (-13,10x), ATP sintase (-15,70x), HSP90 (-16,68x), OAT (-4,07x) e PKM2 (-2,17x). As proteínas Hspd1, fosfoproteína induzida por estresse 1, enolase 1 alfa, citocromo c e proibitina estavam presente somente nos géis controle.

As alterações detectadas nas proteínas vimentina, OAT e proibitina poderiam indicar que o <sup>1</sup>O<sub>2</sub> estaria induzindo uma malignização dos melanócitos, pois diminuição dos níveis de vimentina e ATP sintase foram detectadas em um estudo anterior que

comparou o proteoma da linhagem Melan-a com duas linhagens tumorais (Tm1 e Tm5) derivadas da Melan-a (DE SOUZA *et al.*, 2006). A diminuição nos níveis de prohibitina induziria a um crescimento desordenado, uma vez que essa proteína é um importante supressor de tumor com implicações no ciclo celular (JOSHI *et al.*, 2003), exercendo uma potente atividade antiproliferativa (JUPE *et al.*, 1995). Porém, a diminuição dos níveis das proteínas de choque térmicos (HSP90, Hspd1, fosfoproteína induzida por estresse 1) apontam para o sentido oposto, pois essas proteínas são responsáveis pela manutenção da integridade celular e geralmente estão superexpressas em tumores, estando ainda correlacionadas com proliferação e diferenciação tumoral (CIOCCA e CALDERWOOD, 2005).

A diminuição dos níveis de citocromo c e PKM2 pode indicar uma possível diminuição no metabolismo, reduzindo a produção de ATP e dificultando a proliferação celular, uma vez que, essas características já foram encontradas por (TSAI *et al.*, 2005) quando fotossensibilizaram células de fibroblastos com ácido aminolevulínico e encontraram disfunções mitocondriais.

**Tabela 3.** PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS - MALDI-TOF NA LINHAGEM MELAN-A APÓS TRATAMENTO COM DHPNO<sub>2</sub>.

No <sup>(a)</sup>	Proteína <sup>(b)</sup>	Cobertura % <sup>(c)</sup>	No. de peptídeos equivalentes	Número de acesso NCBI <sup>(d)</sup>	Massa/PI <sup>(e)</sup>	MASCOT Score <sup>(f)</sup>	Regulação após DHPNO <sub>2</sub> <sup>(g)</sup>
1	Vimentina	21	7	CAA27396	42.066/5.30	72	-13.10
2	Proteína de choque térmico 70 (HSP70)	14	7	AAA37869	71.021/5.37	80	+1.69
3	Gama-actina	29	9	CAA31455	41.335/5.56	85	+1.45
4	ATP sintase subunidade beta, F1(ATP sintase)	35	11	ABD77233	48.047/4.90	116	-15.70
5	Proteína regulada por glucose 78-kDa	16	8	NP71705	72.492/5.07	107	+1.01
6	Hspd1	17	8	AAI06113	59.559/8.09	81	<sup>(h)</sup>
7	Proteína de choque térmico 90 (HSP90)	31	9	NP32328	83.571/4.97	149	-16.68
8	Fosfoproteína induzida por estresse 1	16	10	NP58017	63.170/6.40	173	<sup>(h)</sup>
9	Enolase 1, cadeia	35	10	NP1020559	47.453/6.37	99	<sup>(h)</sup>
10	Citocromo c – isoforma CRA_a	65	17	EDL09352	11.135/5.13	91	<sup>(h)</sup>
11	Proibitina	24	7	NP32857	29.859/5.57	77	<sup>(h)</sup>
12	Ornitina amino Transferase	20	10	NP58674	48.723/6.19	95	-4.07

No <sup>(a)</sup>	Proteína <sup>(b)</sup>	Cobertura % <sup>(c)</sup>	No. de peptídeos equivalentes	Número de acesso NCBI <sup>(d)</sup>	Massa/PI <sup>(e)</sup>	MASCOT Score <sup>(f)</sup>	Regulação após DHPNO <sub>2</sub> <sup>(g)</sup>
13	Piruvato kinase, isoforma M2 (PKM2)	12	5	NP35229	58.378/7.18	70	-2.17

<sup>(a)</sup>Números dos *spots* indicados na Figura 20A e B. <sup>(b)</sup> Nome das proteínas de acordo com o banco de dados NCBI. <sup>(c)</sup> Cobertura da sequência das identificações por MS. <sup>(d)</sup> número de acesso no banco de dados NCBI. <sup>(e)</sup> Massa molecular/pi teóricos. <sup>(f)</sup> MASCOT “score”; o “score” nesse banco de dados para a espécie em estudo (*Mus musculus*) é considerado aceitável ( $p < 0,05$ ) quando o valor é maior que 64. <sup>(g)</sup> “+” e “-” indica aumento ou diminuição na média dos volumes dos *spots* das células tratadas em relação às células controle. <sup>(h)</sup> Proteínas difíceis de visualizar em géis após o tratamento com DHPNO<sub>2</sub>.

As Figuras 21A e 21B mostram imagens representativas dos géis 2-DE de células B16-F10 controle e tratadas. Aproximadamente 442 *spots* foram detectados na amostra controle, enquanto 359 *spots* foram detectados em amostras de células após tratamento com endoperóxido. Análises comparativas entre esses grupos detectaram 247 *spots* presentes nas duas condições (*matches*), sendo 33 *matches* com regulação aumentada e 28 (*matches*) com regulação diminuída, após tratamento. Adicionalmente, 195 *spots* foram detectados somente nas amostras controle, enquanto 112 *spots* presentes apenas após o tratamento. Esses dados estão simplificados na figura 22. As proteínas identificadas por espectrometria de massas estão descritas na tabela 4.

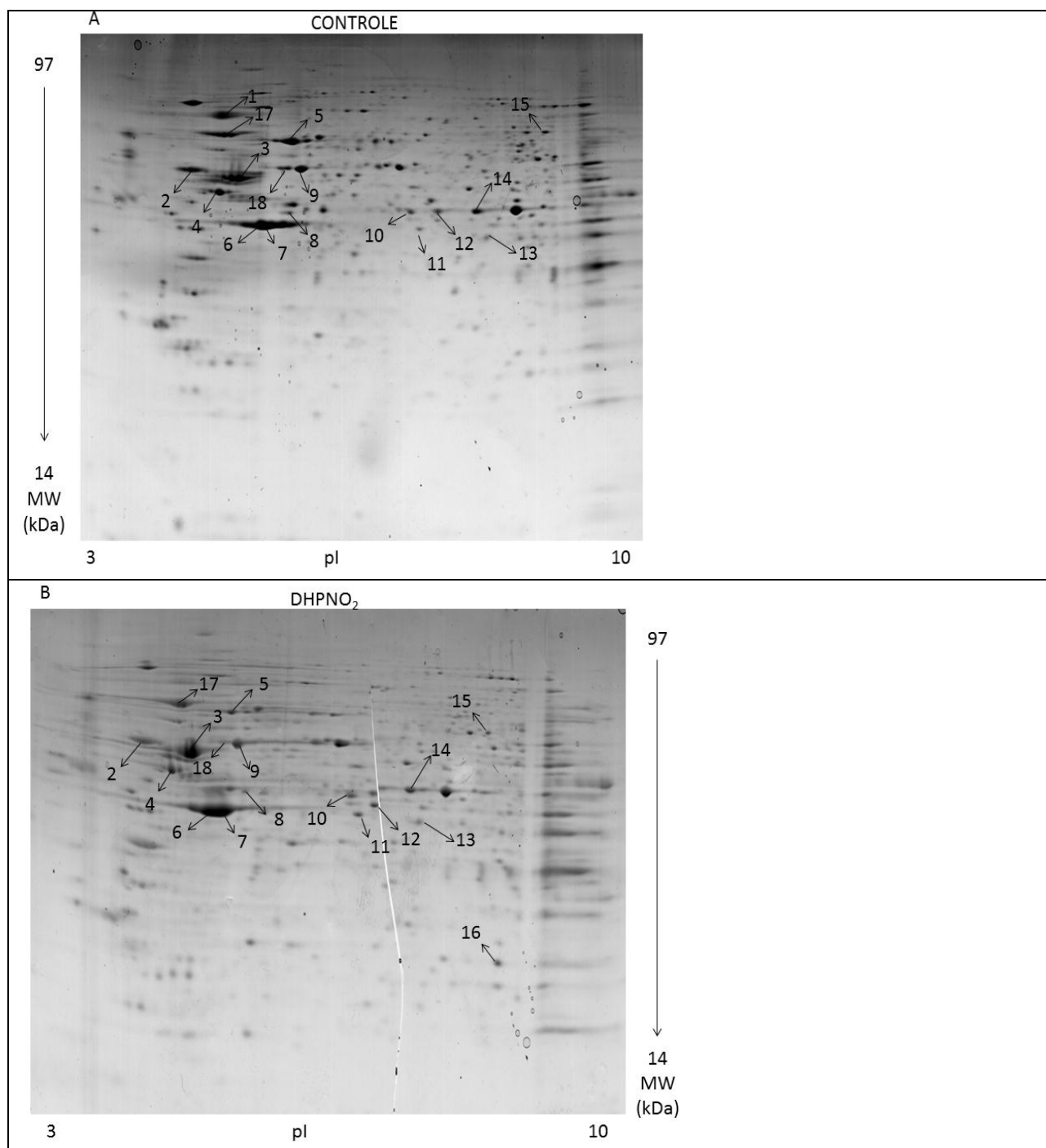


FIGURA 21 – ELETROFORESE BIDIMENSIONAL DA LINHAGEM B16-F10 APÓS TRATAMENTO COM DHPNO<sub>2</sub>

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: (A) Gel 2-DE representativo de células controle (10 mM de DHPN). (B) Gel 2-DE representativo de células após tratamento com 10 mM de DHPNO<sub>2</sub>. Um total de 500 µg de proteína foi submetida à focalização isoeétrica usando tiras de pH 3 a 10 não-linear, seguidos por separação em gel 12,5% de poliacrilamida (SDS-PAGE). As setas indicam as proteínas identificadas por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF e estão listados na Tabela 4.

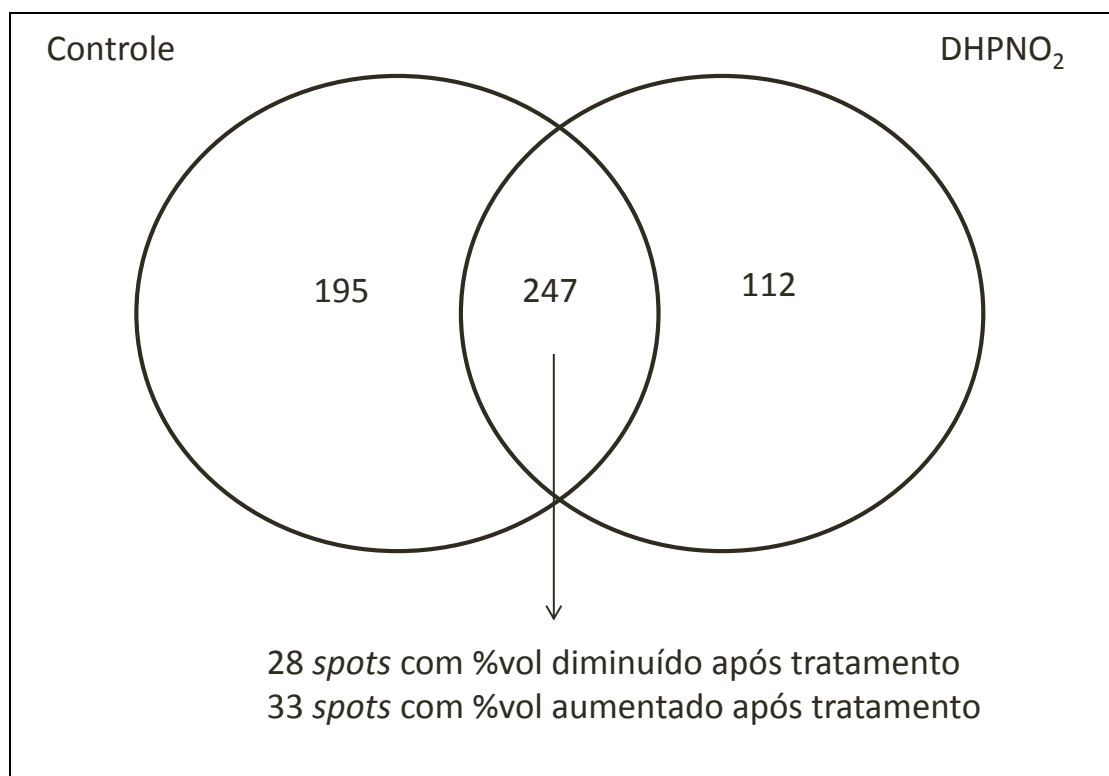


FIGURA 22 – DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE *SPOTS* DOS GÊIS REPRESENTADOS NA FIGURA 21A E B.

FONTE: O Autor (2012)



**Tabela 4.** PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS - MALDI-TOF NA LINHAGEM B16-F10 APÓS TRATAMENTO COM DHPNO<sub>2</sub>.

No <sup>(a)</sup>	Proteína <sup>(b)</sup>	cobertura % <sup>(c)</sup>	No. de peptídeos equivalentes	Número de acesso NCBI <sup>(d)</sup>	Massa/pl <sup>(e)</sup>	MASCOT Score <sup>(f)</sup>	Regulação após DHPNO <sub>2</sub> <sup>(g)</sup>
1	Proteína de choque térmico 90 (HSP90)	28	19	NP32328	83.571/4.97	152	<sup>(h)</sup>
2	Prolil 4-hidroxilase	25	11	EDL34765	59.440/4.78	105	-1.27
3	Vimentina	36	11	CAA27396	42.066/5.30	132	+1.68
4	ATP sintase subunidade beta, F1(ATP sintase)	39	14	ABD77233	48.047/4.90	153	-1.21
5	Complexo chaperona, cadeia A	21	6	3CQX_A	42.431/6.69	64	-4.58
6	Beta-actina	19	10	CAA27396	42.066/5.30	86	-1.28
7	Gama-actina	26	10	CAA31455	41.335/5.56	112	+2.84
8	Asparaginase like 1	21	8	NP79886	34.385/7.56	80	+1.29
9	HSPA8	11	6	AAI06170	62.288/5.30	77	-1.34
10	Ornitina amino Transferase	18	9	NP58674	48.723/6.19	87	-3.00
11	Proteína aldolase redutase- 2	36	12	NP32038	36.309/5.97	128	+2.62
12	Enolase 1, cadeia alfa	23	6	NP1020559	47.453/6.37	82	+4.57
13	mCG 15232, isoforma	20	5	EDL26401	38.315/9.13	87	+1.36

No <sup>(a)</sup>	Proteína <sup>(b)</sup>	cobertura % <sup>(c)</sup>	No. de peptídeos equivalentes	Número de acesso NCBI <sup>(d)</sup>	Massa/pi <sup>(e)</sup>	MASCOT Score <sup>(f)</sup>	Regulação após DHPNO <sub>2</sub> <sup>(g)</sup>
CRA_b							
14	Enolase 1, cadeia alfa	30	9	NP1020559	47.453/6.37	110	-1.07
15	Piruvato kinase, isoforma M2	18	9	NP35229	58.378/7.18	100	-1.64
16	“Novel protein” <sup>(i)</sup>	21	5	CAM18174	25.866/9.54	84	<sup>(i)</sup>
17	Proteína regulada por glucose 78-kDa	20	16	NP71705	72.492/5.07	124	-1.09
18	Proteína de choque térmico 60 HSP60 <sup>(j)</sup>	18	8	BAE39984	58.423/6.19	79	-2.24

<sup>(a)</sup>Números dos *spots* indicados na Figura 21A e B. <sup>(b)</sup> Nome das proteínas de acordo com o banco de dados NCBI. <sup>(c)</sup> Cobertura da sequência das identificações por MS. <sup>(d)</sup> número de acesso no banco de dados NCBI. <sup>(e)</sup> Massa molecular/pi teóricos. <sup>(f)</sup> MASCOT “score”; o “score” nesse banco de dados para a espécie em estudo (*Mus musculus*) é considerado aceitável ( $p < 0,05$ ) quando o valor é maior que 64. <sup>(g)</sup> “+” e “-” indica aumento ou diminuição na média dos volumes dos *spots* das células tratadas em relação às células controle. <sup>(h)</sup> Proteína difícil de visualizar em géis após o tratamento com DHPNO<sub>2</sub>. <sup>(i)</sup> Proteína difícil de visualizar em géis controle. <sup>(j)</sup> proteínas desconhecidas, as quais as sequências foram analisadas pelo programa Motifscan e então classificadas.

Dentre as proteínas que tiveram diferença nos valores das médias das porcentagens de volume dos *spots* (acima de 2x) são as seguintes: Complexo Chaperona (-4,58x), gama-actina (+2,84x), ornitina aminotransferase (-3,00x), Aldolase reductase-related protein 2 (+2,62x), enolase 1 alfa (+4,57x) e HSP60 (-2,24x). A proteína HSP90 está presente somente nos géis controle e a “novel protein” está presente somente nos géis tratados.

Análises da sequência da “novel protein” sugerem que essa proteína faça parte da família das nebulinas, que regulam os filamentos de actina (PAPPAS *et al.*, 2011), e dentre os membros dessa família, a sequência se enquadra no membro LASP-1, que tem peso molecular baixo, envolvida em modulação da proliferação tumoral (GRUNEWALD *et al.*, 2007).

A diminuição dos níveis do complexo chaperona, HSP60 e HSP90 indicam uma toxicidade do  $^1\text{O}_2$  nas células de melanoma, o que seria esperado já que essa espécie é produzida pela terapia fotodinâmica, usada como tratamento do melanoma. Porém, o aumento das demais proteínas indica um possível aumento das taxas metabólicas, visando à recuperação das células, mais especificamente o aumento de enolase alfa, pois sua superexpressão pode resultar em aquisição de mais plasminogênio e espalhamento das células tumorais (REDLITZ *et al.*, 1995).

#### 6.2.4. RT-qPCR após tratamento com DHPNO<sub>2</sub>

Os resultados de proteômica mostram que o tratamento com endoperóxido gera várias alterações, com base nisso, foi investigado se algumas proteínas apresentavam essas alterações a nível transcricional, através de ensaios de RT-pPCR. OAT, HSP90, vimentina, PKM2 e ATP sintase foram escolhidas de acordo com a importância de suas funções na dinâmica tumoral, independente da alteração nos estudos proteômicos (figura 23). Os experimentos de RT-qPCR foram realizados após 14 e 36 horas do tratamento das células com o endoperóxido, pois se esperava obter dados sobre uma resposta mais tardia, na tentativa de detectar alguma sinalização desencadeada pelo oxigênio singlete.

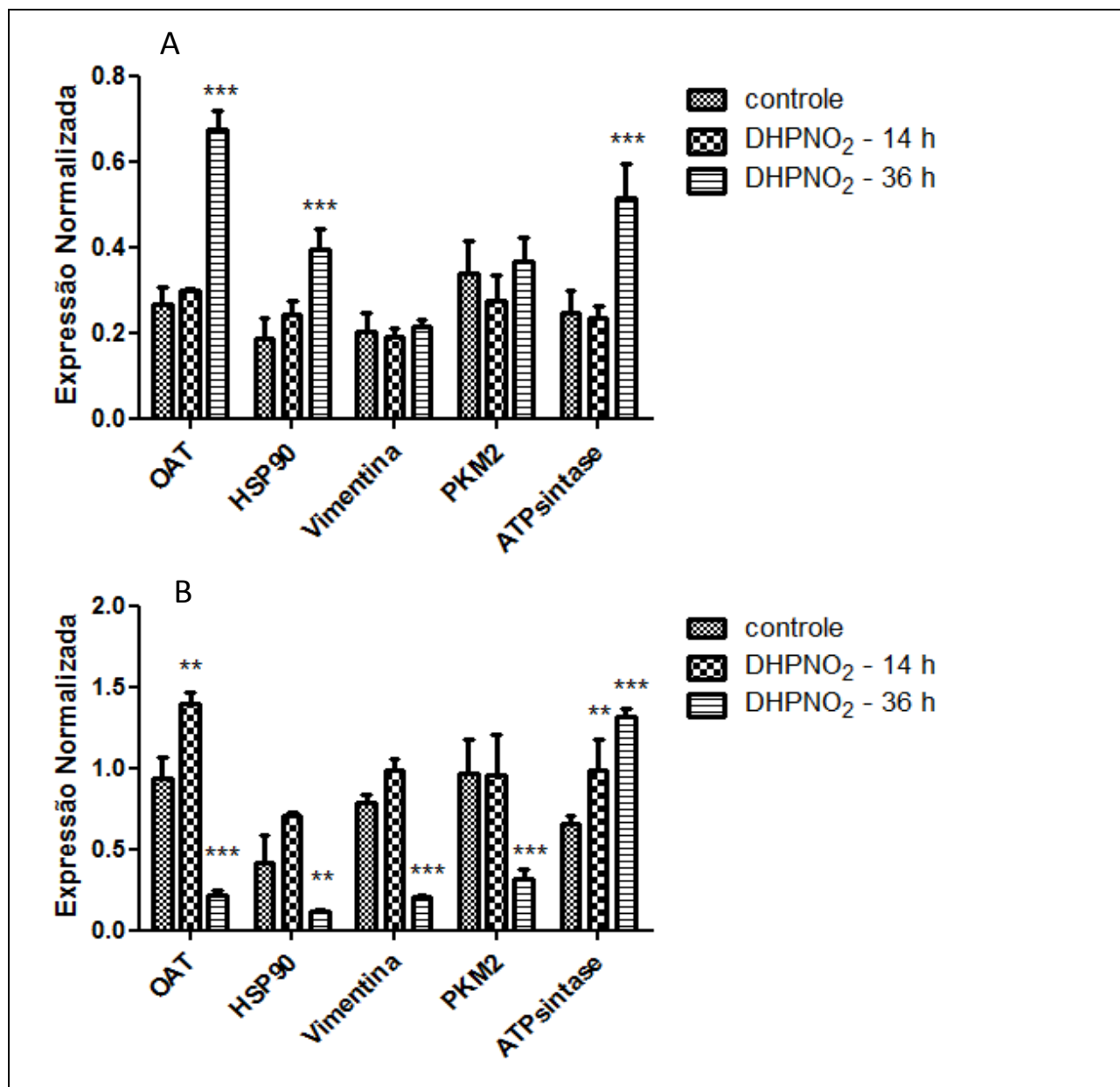


FIGURA 23 – RT-qPCR APÓS TRATAMENTO COM DHPNO<sub>2</sub>

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: Dados de RT-qPCR dos genes OAT, HSP90, Vimentina, PKM2 e ATP sintase, em (A) Melan-a e em (B) B16-F10. Os resultados estão apresentados como expressão relativa de cada transcrito normalizada pelos genes de GAPDH e HPRT. Os experimentos foram realizados após 14 h e 36 h a partir do fim do tratamento com DHPNO<sub>2</sub>. Nesses ensaios o controle foi tratada com 10 mM de DHPN e o tratamento foi realizado com 10 mM de DHPNO<sub>2</sub> por 2 h. Os dados estão apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes (ANOVA \*\*p<0,05; \*\*\*p<0,001).

Na linhagem Melan-a, os níveis de RNA mensageiro dos genes OAT, HSP90 e ATP sintase aumentaram somente após 36 h. Já na linhagem de melanoma, B16-F10, a expressão do gene OAT aumentou após 14 h e diminuiu após 36 h, para o HSP90,

vimentina e PKM2 houve apenas diminuição após 36 h, e aumento de ATP sintase após 14 e 36 h.

A proteína OAT é uma enzima mitocondrial envolvida no metabolismo da ornitina (LEI *et al.*, 2008). A OAT teve seus dados de proteômica contrários aos dados de RT-qPCR. O aumento na expressão do gene de OAT após 36 horas em melanócitos é importante, uma vez que o tratamento com  $^1\text{O}_2$  pode gerar apoptose (TAO e LEVINE, 1999) e de acordo com estudo anteriores (LIU, H. Y. *et al.*, 2008), essa proteína é aumentada em morte celular induzida por ROS, podendo prevenir acúmulo de amônia. Porém, no caso da linhagem de melanoma, acredita-se que a proteína tenha sofrido uma modificação pós-traducional, podendo uma quantidade dessa proteína estar localizada em outra região do gel e não ter sido detectada, isso porque já foi demonstrado que o  $^1\text{O}_2$  pode gerar modificações pós-traducionais (WRIGHT *et al.*, 2002; CATALGOL *et al.*, 2009; GRACANIN *et al.*, 2009).

A função de HSP90 é assegurar a conformação, atividade e turnover de proteínas (ORTIZ e KINZY, 2005). Essa proteína participa de um complexo multichaperonas e algumas proteínas alvos fazem parte da sinalização de Ras que envolve proliferação e atividade anti-apoptose (CARAGLIA e FABBROCINI, 1999). No caso da chaperona HSP90, em melanócitos houve uma diminuição na abundância do *spot* da proteína, porém houve um aumento nos níveis de RNA mensageiro que pode ter sido desencadeada pelo fator de transcrição de *heat-shock* HSF-1 (NECKERS, 2007). Esse aumento de transcrição de RNA de HSP90 é fundamental para a sobrevivência celular, devido às suas proteínas alvo, que fazem parte principalmente do bom andamento do ciclo celular. No caso da linhagem de melanoma B16-F10, os níveis proteicos e gênicos diminuíram, o que pode estar colaborando para a morte celular. Esses dados mostram que o  $\text{DHPNO}_2$  pode ter como alvos proteínas HSP, pois além da HSP90, as proteínas HSP60, Hspd1, complexo chaperona e HSPA8 tiveram seus níveis diminuídos. A única proteína dessa família que não teve seus níveis diminuídos foi a HSP70 na linhagem Melan-a, que é um membro das *heat-shock* mais conservado, e atua coordenando os processos de dobramento e desnaturação realizados por outras HSPs (MAYER e BUKAU, 2005), podendo ser a responsável pela sobrevivência dessa linhagem frente ao tratamento com o endoperóxido.

Esses dados de HSPs mostram que esse tratamento pode ser muito eficaz em melanomas, uma vez que a chaperona HSP90 tem sido alvo de terapias, pois sua baixa expressão ou sua inibição diminui a expressão de survivinas, AKT, HIF-1 $\alpha$ , MMP-2 e VEGF (FERRARIO e GOMER, 2010).

A vimentina teve seus níveis bem diminuídos em melanócitos e não em melanomas, porém, nos experimentos de RT-qPCR pode-se ver que não há alteração nos níveis de RNA mensageiro em melanócitos, porém uma diminuição significativa em melanoma. Em estudos que utilizaram a PDT com *siliconphthalocyanine* em células de linfócitos, foi mostrado que a quebra da vimentina está envolvida com apoptose, porém os dados nesse estudo foram controversos e os autores dizem que a vimentina pode apresentar duas funções, podendo desencadear sinalizações de sobrevivência ou morte, quando a célula é exposta ao estresse oxidativo (BELICHENKO, MORISHIMA e SEPAROVIC, 2001). No presente estudo, pode-se perceber que há claramente uma resposta diferente nas duas linhagens celulares. Em melanócitos, há uma diminuição na regulação da proteína, indicando um possível quebra da proteína, sem mecanismo de aumento na expressão. Isso pode estar relacionado a um mecanismo de resistência, uma vez que, os dados de viabilidade celular, evidenciam que as células são resistentes a esse tratamento. Já no melanoma, os níveis proteicos são praticamente os mesmos, porém o tratamento parece ter desencadeado uma sinalização que promoveu a diminuição da transcrição, o que poderia estar relacionado a diminuição da viabilidade destas células (Figura 18).

No caso da enzima PKM2, houve uma tendência à diminuição no volume do *spot* tanto nos melanócitos (-2,17 – Tabela 3) como em melanomas (-1,65 – Tabela 4), porém, os resultados de RT-qPCR não evidenciaram diferenças nos melanócitos, mas sim na linhagem de melanoma. Nesta última houve queda significativa nos níveis de mRNA após 36 horas de tratamento. Esses dados mostram mais uma vez, que o melanócito é resistente ao tratamento, ao passo que as células de melanoma são significativamente afetadas com a diminuição no volume de uma enzima glicolítica essencial à sua sobrevivência (CHRISTOFK *et al.*, 2008).

A enzima ATP sintase em ambas as linhagens teve seus níveis proteicos diminuídos, ao contrário dos níveis de RNA mensageiro que aumentaram. Esses dados

podem ser explicados por uma possível modificação pós-traducional gerada pelo tratamento, fazendo com que os níveis de proteína detectadas na 2-DE não correspondem aos reais níveis da proteína, podendo o *spot* dessa proteína estar localizado em outra região do gel, o mesmo que aconteceu com a enzima OAT. A alteração nessas proteínas pode indicar possíveis danos mitocondriais, pois isso já foi visto em outros estudos usando PDT (HILF, 2007; CHEN *et al.*, 2008).

As possíveis modificações pós-traducionais em diferentes proteínas podem desencadear processos que levam à morte celular. Neste contexto (MAGI *et al.*, 2004) demonstraram que a presença de Purpurina-18 em células HL60, promove a carbonilação de GRP78, HSP60, HSP71, PDI, beta-actina, tubulina alfa e alfa enolase, e que esta modificação desencadeia apoptose.

Esses resultados de proteoma e de RT-qPCR permitem concluir que o tratamento gera mudanças na expressão de proteínas importantes para o correto funcionamento celular, principalmente na linhagem de melanoma. Além de indicar um efeito direcionado do  $^1\text{O}_2$ , pois o padrão de alteração do perfil protéico e de expressão de determinados genes nas duas linhagens indica que a resposta à essa espécie reativa não é indiscriminada. Por isso, decidiu-se também avaliar os níveis de expressão gênica de supressores de tumor, para detectar se o tratamento seria capaz de inibir a proliferação de células tumorais.

#### 6.2.5. Efeitos do tratamento com DHPNO<sub>2</sub> sobre a expressão de genes de supressores de tumor

Foram realizados experimentos de RT-qPCR para quantificar os níveis de RNA mensageiro de importantes supressores de tumor (p19, p21, p27 e p53) (COLLADO e SERRANO, 2006). Os resultados mostraram que o tratamento com DHPNO<sub>2</sub> em células Melan-a promovem um aumento significativo nos níveis de mRNA de p19 (2 vezes) e p27 (2 vezes) somente após 36 horas e nenhuma alteração nos níveis de mRNA de p53 (figura 24A). A expressão de p21 não pôde ser avaliada, pois o primer não amplificou nada, indicando uma possível ausência ou baixa quantidade desses mRNA. Não houve alterações no tempo de 14 horas. Possivelmente o aumento da expressão dos

supressores de tumor p19 e p27 evidenciam uma sinalização para parada de ciclo, mas como não foi verificada diminuição na viabilidade nesse tempo, é possível que esse resultado seja um indicativo do início de um processo que poderia ser evidenciado com análise da proliferação celular em tempos mais longos.

Nas células B16-F10, não houve alterações em p19 e aumento significativo nos níveis de RNA mensageiro nos genes de p21, p27 e p53 após 36 horas. Também não houve alterações no tempo de 14 horas (figura 24B).

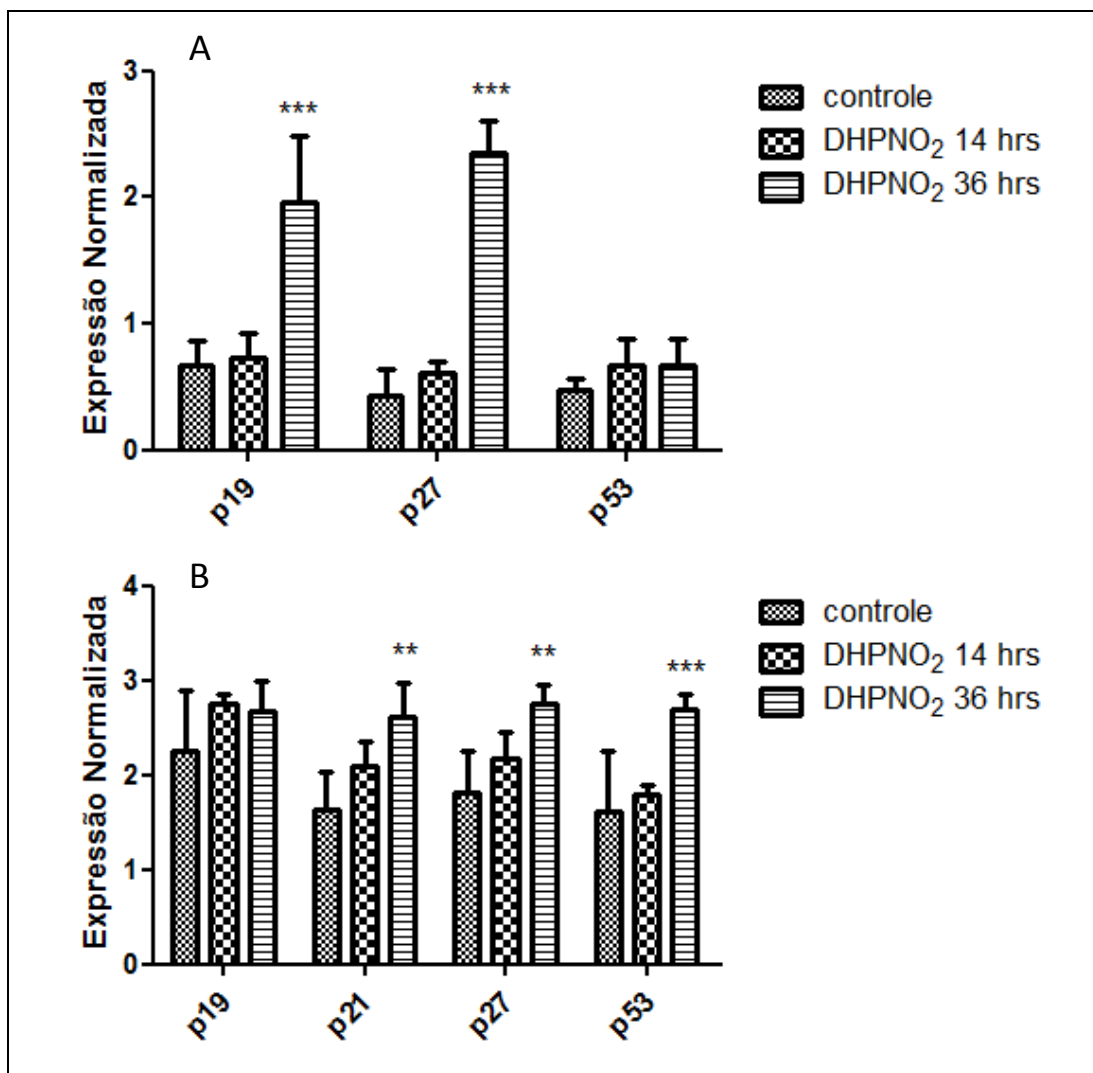


FIGURA 24 – EFEITOS DO DHPNO<sub>2</sub> NA EXPRESSÃO DE SUPRESSORES DE TUMOR  
 FONTE: O Autor (2012)

NOTA: (A) Resultados de RT-qPCR dos genes p19, p21, p27 e p53 em (A) Melan-a e em (B) B16-F10. Os resultados estão apresentados como expressão relativa de cada transcrito normalizada pelos genes de GAPDH e HPRT. Os experimentos foram realizados após 14 h e 36 h a partir do fim do tratamento com DHPNO<sub>2</sub>. Nesses ensaios o controle foi tratada com 10 mM de DHPN e o tratamento foi realizado com 10 mM de DHPNO<sub>2</sub> por 2 h. Os dados estão apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes (ANOVA \*\*p < 0,05; \*\*\*p < 0,001).



Nas células B16-F10, o aumento de p21 pode estar relacionado ao aumento de p53. Neste contexto, (SAROSI, RIEBER e RIEBER, 2003) demonstraram que o tratamento de células B16 com peróxido de hidrogênio gerou aumento de algumas proteínas reguladas pela p53, mais precisamente a proteína p21 e proteínas pró-apoptóticas. Além disso, o aumento dos níveis de p53 gera a transativação de genes pró-oxidantes Bax, PUMA, PIG3, p66shc, NQO1 e desbalanços de expressão de MnSOD, GPx1 e Catalase, induzindo acúmulo de ROS (VURUSANER, POLI e BASAGA, 2012).

Em relação à p27, sua transcrição é regulada em parte pela proteína Foxo, uma família de fatores de transcrição que controla a expressão de genes envolvidos em adaptação ao estresse oxidativo (FU e TINDALL, 2008).

Considerando que a indução de p27 gera parada do ciclo celular na fase G1 (BURHANS e HEINTZ, 2009) e que já foi mostrado que a superexpressão de p53 e p21 resulta no aumento de ROS intracelular e induz a senescência celular (MACIP *et al.*, 2003), que também tem como característica parada de ciclo celular (STEIN *et al.*, 1999), decidiu-se avaliar o ciclo celular, para detectar se estava ocorrendo uma parada no ciclo celular após o tratamento, indicando entrada em senescência gerada pelo  $^1\text{O}_2$  em células de melanoma.

#### 6.2.6. Manutenção do ciclo celular após tratamento com DHPNO<sub>2</sub>

Nestes experimentos, as células B16-F10 tiveram seu DNA marcado com iodeto de propídio e através da fluorescência foi possível detectar a quantidade de células em cada fase do ciclo celular (WANG *et al.*, 2008). Como mostra a figura 25, o tratamento com DHPNO<sub>2</sub> não gerou alterações no ciclo celular. Não houve diferença estatística em nenhuma fase do ciclo estudada. Esse experimento foi realizado somente com a linhagem B16-F10.

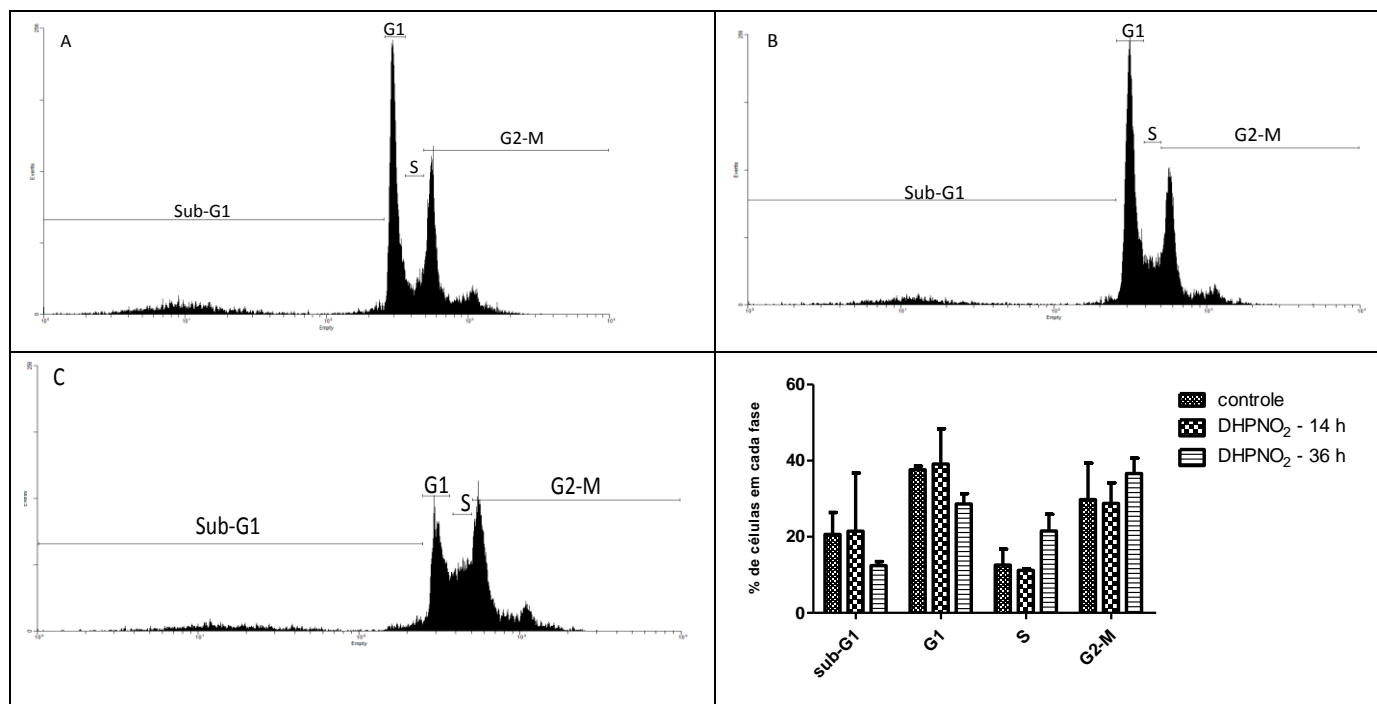


FIGURA 25 –CICLO CELULAR APÓS TRATAMENTO COM DHPNO<sub>2</sub> DA LINHAGEM B16-F10

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: (A) Histograma representativo da análise de citometria de fluxo da linhagem B16-F10 controle (10 mM de DHPN); (B) Histograma representativo da análise de citometria de fluxo da linhagem B16-F10 tratadas com DHPNO<sub>2</sub> 10 mM por 2 h. Após 14 horas a partir do fim do tratamento, as células foram coletadas, lavadas 2x com PBS, marcadas com 25µg/mL de iodeto de propídeo e analisadas no citômetro FACSCalibur, em filtro FL2, monitorado por 10.000 eventos. (C) Histograma representativo da análise de citometria de fluxo da linhagem B16-F10 tratadas com DHPNO<sub>2</sub> 10 mM por 2 h. Após 36 horas a partir do fim do tratamento, as células foram coletadas e marcadas com em (B). (D) Porcentagem de células em cada fase do ciclo celular após o tratamento com DHPNO<sub>2</sub>. Os dados foram analisados através do programa WinMDI 2.9 e representam a média de dois experimentos independentes.

Esses dados de ciclo celular não estão de acordo com os resultados anteriores de expressão de supressores de tumor, a partir dos quais se esperava uma parada no ciclo celular. No entanto, pode-se sugerir que a continuação do ciclo celular seja decorrente da expressão de LASP-1 (detectada no gel da linhagem B16-F10 após o tratamento com <sup>1</sup>O<sub>2</sub> e identificada como “novel protein”), pois essa proteína está envolvida na manutenção do ciclo celular, apesar do aumento dos supressores como resposta ao aumento de ROS. Estudos anteriores, em células de câncer de ovário, mostraram que essa proteína pode modular a proliferação celular e manter o ciclo (GRUNEWALD *et al.*, 2007).

Além disso, em estudo realizado com células de fibroblasto mostrou-se que o tratamento dessas células com UVA promoveu o acúmulo de c-jun fosforilada com ativação de AP-1 (CATALGOL *et al.*, 2009). Por sua vez, AP-1 está envolvida com a

manutenção da proliferação celular por desencadear aumento na expressão de MMP-1, sendo esta mais uma possível explicação para a continuidade do ciclo celular mesmo com a superexpressão de genes de supressores de tumor.

Para uma melhor avaliação das alterações do ciclo celular, seria necessário confirmar os níveis dos supressores de tumor por western blotting, para assim confirmar os resultados obtidos neste trabalho em relação à resposta do ciclo celular frente ao tratamento com DHPNO<sub>2</sub>.

#### 6.2.7. Efeitos do tratamento com DHPNO<sub>2</sub> sobre o processo de senescência celular

Já foi mostrado o papel das ROS no desencadeamento de senescência iniciado por danos ao DNA e que estes contribuem para a manutenção de focos de danos ao DNA em longo prazo, gerando fenótipo de senescência irreversível (PASSOS *et al.*, 2010). Estes resultados podem ser relevantes para estudos terapêuticos com ROS, com o objetivo de modular os seus níveis intracelulares no envelhecimento e no câncer.

Portanto, foi investigada uma possível promoção da senescência celular nas células de melanoma sob ação do <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, uma vez que alterações na expressão de supressores de tumor foram detectadas. O teste utilizado foi de β-galactosidase, que se apoia no fato de que na senescência celular há superexpressão e acúmulo da enzima beta-galactosidase nos lisossomos (DEBACQ-CHAINIAUX *et al.*, 2009). Os resultados desses experimentos estão apresentados na figura 26 e foram observadas poucas células marcadas para atividade de β-galactosidase para as condições controle e após 14 horas do fim do tratamento com DHPNO<sub>2</sub>. No tempo de 36 horas, pode-se notar o aumento no número de células marcadas.

Esse aumento em 36 horas está de acordo com o aumento dos genes supressores de tumor após 36 horas, possivelmente indicando que o oxigênio singlete gera uma resposta tardia nessas células e desencadeia a indução a senescência celular, pois já foi descrito que ROS podem levar as células à senescência (BURHANS e HEINTZ, 2009).

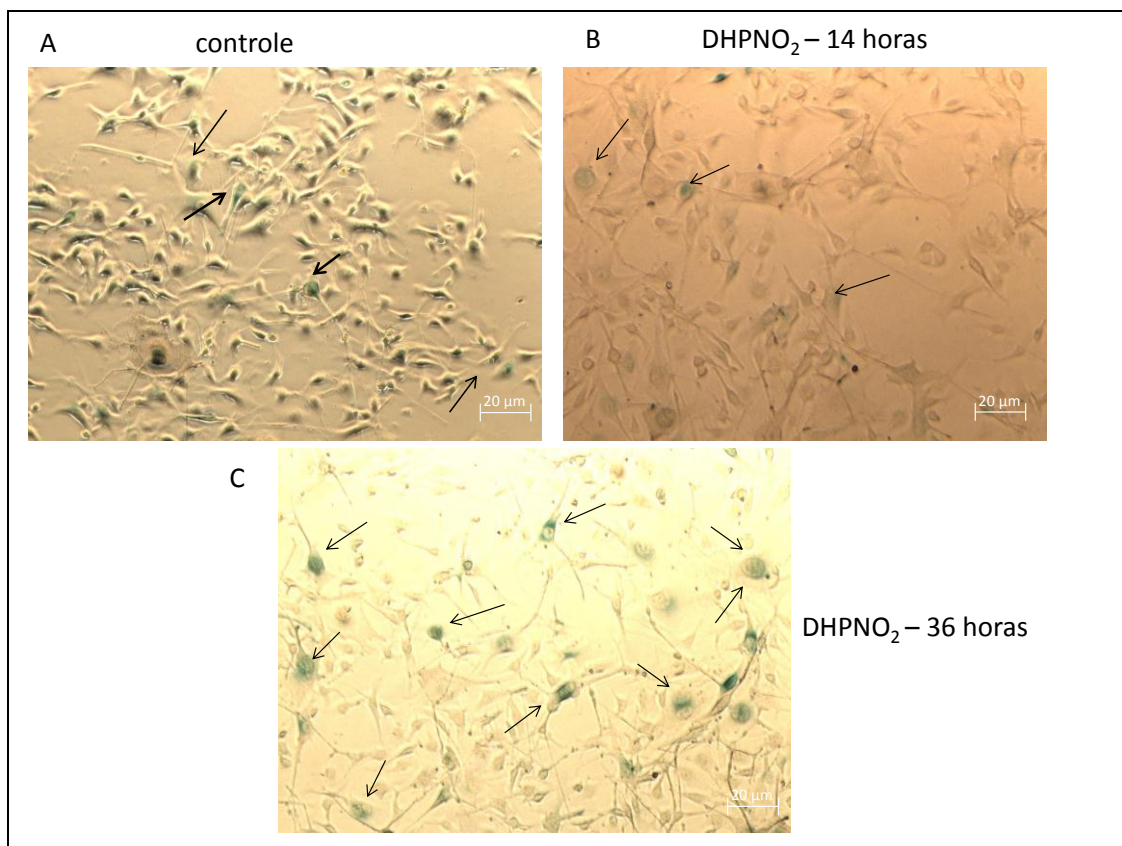


FIGURA 26 – EFEITOS DO TRATAMENTO COM DHPNO<sub>2</sub> SOBRE O PROCESSO DE SENESCÊNCIA CELULAR.

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: Micrografias representativas das células B16-F10 controle (A) e células tratadas com DHPNO<sub>2</sub> – 14 horas (B) e 36 horas (C). As células foram plaqueadas, tratadas, coradas usando o kit de coloração para  $\beta$ -galactosidase e foram analisadas usando um microscópio óptico). As setas indicam células coradas para Beta-galactosidase.

## 7 – DISCUSSÃO FINAL

A biosíntese de melanina é influenciada por vias de regulação e condições específicas do micro-ambiente celular, dentre essas, a modificação do pH pode afetar diretamente a atividade da tirosinase, e por consequência a produção do pigmento (ANCANS *et al.*, 2001). No presente estudo, o estímulo da melanogênese com uso do  $\text{NH}_4\text{Cl}$  gerou a produção de melanina em excesso nas células de melanoma e não nos melanócitos, mostrando que a via de produção da melanina em células de melanoma responde diferentemente aos estímulos, tendo o pH uma função mais crucial nessas células.

Alguns autores demonstraram que a síntese de melanina artificial pode gerar  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas reações de polimerização envolvendo os intermediários quinonas e sugeriram que essa produção também poderia ocorrer intracelularmente (SZATROWSKI e NATHAN, 1991; NAPPI, 1996; PAVEL *et al.*, 2004). O presente estudo contribuiu nesse sentido ao mostrar claramente um aumento nos níveis de ROS dentro das células após 15 h de estímulo da melanogênese, confirmando a importância de ROS nesse processo, que poderia contribuir na resposta celular, incluindo a ativação de fatores de transcrição e via de sinalização.

A inibição da proliferação celular e parada de ciclo celular na fase G1, além do aumento dos níveis de RNA mensageiro de p21 e indução de quiescência celular evidenciaram que a melanogênese afeta de forma complexa o comportamento celular, o qual acreditamos ser uma estratégia de recuperação, evitando um possível processo de morte celular que estaria sendo desencadeado pelos intermediários tóxicos que escaparam dos melanossomos durante a melanogênese. Alguns autores descrevem que para as células se tornarem quiescentes é necessário haver baixo aporte nutricional e parada no ciclo celular, mas ainda não foram totalmente esclarecidos os mecanismos moleculares determinantes para entrada das células em quiescência (LAPORTE *et al.*, 2011).

Com os resultados indicando que as células estariam entrando em quiescência e com a escassez de trabalhos em análises proteômicas com relação à melanogênese, nós examinamos o perfil proteico em células B16-F10 após o estímulo com L-tirosina/ $\text{NH}_4\text{Cl}$  por análises proteômicas e observamos que, de fato, o estímulo da

melanogênese altera significativamente a abundância de diversas proteínas. Por exemplo, a presença dos *spots* das proteínas HSP90 e CDK3 foram observadas somente nos géis de amostras controle, enquanto proibitina teve seus níveis aumentados após o estímulo, essas alterações em conjunto corroboram com a parada de ciclo celular já que HSP90 é importante para o funcionamento de proteínas do ciclo celular (CARAGLIA e FABBROCINI, 1999) e a CDK3 estimula fatores de crescimento (BRAUN *et al.*, 1998). Outro achado importante foi o aumento de PDIA3, HSP70 e OAT, pois forneceu indicativo de um estado de recuperação celular.

As alterações detectadas, tanto em proteômica como nos experimentos de RT-qPCR, indicaram uma possível diminuição do metabolismo anaeróbico e considerando que as células tumorais utilizam metabolismo anaeróbico para produção de energia, pudemos perceber que as células devem estar mantendo apenas o metabolismo basal para a sobrevivência, o que é uma característica de células quiescentes. Um comportamento similar com diminuição na proliferação e aumento no número de células quiescentes havia sido descrito para células de melanoma sob depleção de glucose (CEDROLA, 2004).

Considerando que a melanogênese que ocorre em células de melanoma é considerada como um sistema que diminui a resposta à quimioterapia (CHEN *et al.*, 2009), o presente trabalho contribui para mostrar que as células de melanoma são capazes de desencadear um processo de proteção ao estímulo da melanogênese, entrando em quiescência por um tempo determinado, enquanto o microambiente for desfavorável ao crescimento. Em melanócitos, o processo de melanogênese ocorre dentro de melanossomos normais, que previnem o contato dos compostos tóxicos com outros compartimentos celulares, o que não acontece em melanomas, pois seus melanossomos são anormais, sendo esse processo de melanogênese tóxico às células (BOROVANSKÝ, 1991).

Porém, nosso trabalho levanta uma nova discussão a cerca da produção de melanina. O que afeta mais as células, as espécies reativas formadas durante o estímulo ou a própria melanina? A formação de ROS é consequência da via da melanogênese e, portanto as células desenvolveram mecanismos de entrada em quiescência para se defenderem desse contexto? A resposta para essas perguntas são

perspectivas para trabalhos futuros, bem como, tentar definir em qual ponto de regulação as células estão entrando em quiescência, pois essas informações podem ajudar a decifrar os mecanismos pelo qual esses tumores se defendem de radioterapias e quimioterapias e com isso, poder contribuir com estudos futuros de melhores terapias para os melanomas.

Em relação ao tratamento com  $\text{DHPNO}_2$ , estudos anteriores mostraram que o  $^1\text{O}_2$  tem diversos efeitos, podendo estar envolvido em vias de sinalização (AGNEZ-LIMA *et al.*, 2012). No presente estudo, o tratamento com endoperóxido gerador de  $^1\text{O}_2$  promoveu a diminuição na viabilidade somente de células de melanoma, mostrando um mecanismo de resposta diferenciado dos melanócitos frente a essa espécie reativa.

As análises proteômicas das células de Melan-a tratadas com  $^1\text{O}_2$  mostraram alterações nas proteínas vimentina, OAT e proibitina, as quais poderiam indicar uma tendência à malignização dos melanócitos, uma vez que foram mostradas alterações nessas proteínas em modelo de progressão tumoral de melanoma (DE SOUZA *et al.*, 2006). Porém, a observação de baixos níveis das proteínas de choque térmico (HSPs), podem estar contribuindo para a proteção e manutenção das características normais dessas células, uma vez essas proteínas são essenciais para a sobrevivência dos tumores (CIOCCA e CALDERWOOD, 2005). Quanto aos efeitos em linhagens de melanoma murino B16-F10, houve diminuição dos níveis do complexo chaperona, HSP60 e HSP90, indicando uma toxicidade do  $^1\text{O}_2$  nessas células.

Os dados de RT-qPCR mostram que as duas linhagens respondem diferentemente ao tratamento com  $\text{DHPNO}_2$  e devido às diferenças mostradas comparando com os níveis de proteínas, sugere-se que uma grande quantidade de modificações pós-traducionais sejam geradas pelo tratamento.

Enfim, com os resultados frente ao tratamento com  $\text{DHPNO}_2$  pode-se sugerir que o  $^1\text{O}_2$  tem efeitos dependentes do tipo de linhagem celular. Em células não tumorais, esse radical poderia contribuir para um quadro de malignização, provavelmente com exposição crônica quando os mecanismos de reparo de DNA não conseguem mais proteger as células. Já em células tumorais, esta espécie reativa parece eficaz na indução de morte, porém, isto não é observado em todas as células, permanecendo uma população de células resistentes. Este resultado confere a PDT uma certa

limitação, que poderia ser vencida com terapias adjuvantes que sensibilizassem de forma efetiva as células resistentes a ação de ROS.

Acredita-se que os resultados possam contribuir neste sentido, bem como na construção de novas estratégias de tratamentos para o melanoma.



## 8 – CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nos experimentos realizados com células B16-F10 sob estímulo da melanogênese, é possível concluir que:

- 1) O estímulo da melanogênese promove o aumento dos níveis de ROS após 15 e 18 horas do início do estímulo, com retorno aos níveis basais após 21 horas;
- 2) O estímulo da melanogênese resulta em parada na proliferação celular após 24 horas do seu início, mantendo-se este efeito até 24 horas após a retirada do estímulo;
- 3) A parada na proliferação celular ocorre devido à estagnação do ciclo celular na fase G1, possivelmente relacionada com o aumento dos níveis do supressor de tumor p21;
- 4) O estímulo da melanogênese induz a entrada das células ao estado de quiescência;
- 5) O estímulo da melanogênese promoveu mudanças na regulação de proteínas ligadas ao ciclo celular, proteínas do metabolismo da glucose e proteínas ligadas ao sistema de resistência celular. Estas alterações são concordantes com a parada de ciclo celular e ao estado de quiescência celular.

Pelos resultados obtidos nos experimentos realizados com células Melan-a e B16-F10 sob tratamento com DHPNO<sub>2</sub>, é possível concluir que:

- 1) O tratamento com DHPNO<sub>2</sub> não teve efeitos tóxicos sobre a linhagem Melan-a, porém reduziu a viabilidade das células B16-F10 em 25% e 40%, após 14 h e 36 h, respectivamente;
- 2) O tratamento com DHPNO<sub>2</sub> em células Melan-a e B16-F10 induziu mudanças na regulação de proteínas principalmente ligadas ao metabolismo da glucose e em processos de recuperação proteica;
- 3) Um aumento da expressão de supressores de tumor ocorreu após 36 horas do tratamento com DHPNO<sub>2</sub> para as duas linhagens celulares, sendo que para Melan-a houve aumento em p19 e p27, e para B16-F10 de p21, p27 e p53.
- 4) O tratamento das células B16-F10 com DHPNO<sub>2</sub> não promoveu alterações significativas nas fases do ciclo celular, mas induziu a senescência após 36 horas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-AZIZ, A. F., EL-NAGGAR, M. M. Superoxide dismutase activities in serum and white blood cells of patients with some malignancies. **Cancer Lett**, v. 113, n. 1-2, p. 61-4, Feb 26 1997.

AEBERSOLD, R., GOODLETT, D. R. Mass spectrometry in proteomics. **Chem Rev**, v. 101, n. 2, p. 269-95, Feb 2001.

AGARWALA, S. S., KEILHOLZ, U., GILLES, E., BEDIKIAN, A. Y., WU, J., KAY, R., STEIN, C. A., ITRI, L. M., SUCIU, S., EGGERMONT, A. M. LDH correlation with survival in advanced melanoma from two large, randomised trials (Oblimersen GM301 and EORTC 18951). **Eur J Cancer**, v. 45, n. 10, p. 1807-14, Jul 2009.

AGNEZ-LIMA, L. F., MELO, J. T., SILVA, A. E., OLIVEIRA, A. H., TIMOTEO, A. R., LIMA-BESSA, K. M., MARTINEZ, G. R., MEDEIROS, M. H., DI MASCIO, P., GALHARDO, R. S., MENCK, C. F. DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. **Mutat Res**, Jan 14 2012.

AHMAD, N., ADHAMI, V. M., AFAQ, F., FEYES, D. K., MUKHTAR, H. Resveratrol causes WAF-1/p21-mediated G(1)-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. **Clin Cancer Res**, v. 7, n. 5, p. 1466-73, May 2001.

ANCANS, J., HOOGDUIJN, M. J., THODY, A. J. Melanosomal pH, Pink Locus Protein and their Roles in Melanogenesis. **J Invest Dermatol**, v. 117, n. 1, p. 158-159, 2001.

ANCANS, J., THODY, A. J. Activation of melanogenesis by vacuolar type H(+)-ATPase inhibitors in amelanotic, tyrosinase positive human and mouse melanoma cells. **FEBS Lett**, v. 478, n. 1-2, p. 57-60, Jul 28 2000.

ANCANS, J., TOBIN, D. J., HOOGDUIJN, M. J., SMIT, N. P., WAKAMATSU, K., THODY, A. J. Melanosomal pH controls rate of melanogenesis, eumelanin/phaeomelanin ratio and melanosome maturation in melanocytes and melanoma cells. **Exp Cell Res**, v. 268, n. 1, p. 26-35, Aug 1 2001.

BACHI, A., BONALDI, T. Quantitative proteomics as a new piece of the systems biology puzzle. **J Proteomics**, v. 71, n. 3, p. 357-67, Aug 21 2008.

BAHARVAND, H., FATHI, A., VAN HOOFF, D., SALEKDEH, G. H. Concise Review: Trends in Stem Cell Proteomics. **STEM CELLS**, v. 25, n. 8, p. 1888-1903, 2007.

BALCH, C. M., GERSHENWALD, J. E., SOONG, S. J., THOMPSON, J. F., ATKINS, M. B., BYRD, D. R., BUZAID, A. C., COCHRAN, A. J., COIT, D. G., DING, S., EGGERMONT, A. M., FLAHERTY, K. T., GIMOTTY, P. A., KIRKWOOD, J. M., MCMASTERS, K. M., MIHM, M. C., JR., MORTON, D. L., ROSS, M. I., SOBER, A. J., SONDAK, V. K. Final version of

2009 AJCC melanoma staging and classification. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 36, p. 6199-206, Dec 20 2009.

BANERJI, U. Heat shock protein 90 as a drug target: some like it hot. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 1, p. 9-14, Jan 1 2009.

BELICHENKO, I., MORISHIMA, N., SEPAROVIC, D. Caspase-resistant vimentin suppresses apoptosis after photodynamic treatment with a silicon phthalocyanine in Jurkat cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 390, n. 1, p. 57-63, Jun 1 2001.

BERNARD, K., LITMAN, E., FITZPATRICK, J. L., SHELLMAN, Y. G., ARGAST, G., POLVINEN, K., EVERETT, A. D., FUKASAWA, K., NORRIS, D. A., AHN, N. G., RESING, K. A. Functional Proteomic Analysis of Melanoma Progression. **Cancer Research**, v. 63, n. 20, p. 6716-6725, October 15, 2003 2003.

BHATNAGAR, V., ANJIAH, S., PURI, N., DARSHANAM, B. N., RAMAIAH, A. pH of melanosomes of B 16 murine melanoma is acidic: its physiological importance in the regulation of melanin biosynthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 307, n. 1, p. 183-92, Nov 15 1993.

BISWAS, S., CHIDA, A. S., RAHMAN, I. Redox modifications of protein–thiols: Emerging roles in cell signaling. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 5, p. 551-564, 2006.

BOROVANSKÝ, J., MIREJOVSKÝ, P. AND RILEY, P. A. Possible relationship between abnormal melanosome structure and cytotoxic phenomena in malignant melanoma. **Neoplasma**, v. 38, n. 4, p. 393-400, 1991.

BRANDT, R., KESTON, A. S. Synthesis of diacetyldichlorofluorescein: A stable reagent for fluorometric analysis. **Analytical Biochemistry**, v. 11, n. 1, p. 6-9, 1965.

BRAUN, K., HOLZL, G., SOUCEK, T., GEISEN, C., MOROY, T., HENGSTSCHLAGER, M. Investigation of the cell cycle regulation of cdk3-associated kinase activity and the role of cdk3 in proliferation and transformation. **Oncogene**, v. 17, n. 17, p. 2259-69, Oct 29 1998.

BUCHCZYK, D. P., KLOTZ, L. O., LANG, K., FRITSCH, C., SIES, H. High efficiency of 5-aminolevulinate-photodynamic treatment using UVA irradiation. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 6, p. 879-83, Jun 2001.

BURCHILL, S. A., BENNETT, D. C., HOLMES, A., THODY, A. J. Tyrosinase expression and melanogenesis in melanotic and amelanotic B16 mouse melanoma cells. **Pathobiology**, v. 59, n. 5, p. 335-9, 1991.

BURHANS, W. C., HEINTZ, N. H. The cell cycle is a redox cycle: Linking phase-specific targets to cell fate. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 9, p. 1282-1293, 2009.

CARAGLIA, M., ABBRUZZESE, A., LEARDI, A., PEPE, S., BUDILLON, A., BALDASSARE, G., SELLERI, C., LORENZO, S. D., FABBROCINI, A., GIUBERTI, G., VITALE, G., LUPOLI, G., BIANCO, A.R., TAGLIAFERRI, P. Interferon-alpha induces apoptosis in human KB cells through a stress-dependent mitogen activated protein kinase pathway that is antagonized by epidermal growth factor. **Cell Death Differ**, v. 6, n. 8, p. 773-780, 1999.

CATALGOL, B., ZIAJA, I., BREUSING, N., JUNG, T., HOHN, A., ALPERTUNGA, B., SCHROEDER, P., CHONDROGIANNI, N., GONOS, E. S., PETROPOULOS, I., FRIGUET, B., KLOTZ, L. O., KRUTMANN, J., GRUNE, T. The proteasome is an integral part of solar ultraviolet a radiation-induced gene expression. **J Biol Chem**, v. 284, n. 44, p. 30076-86, Oct 30 2009.

CEDROLA, S. C., ROSANNA; LA PORTA, CATERINA A.M. Effect of glucose stress conditions in BL6T murine melanoma cells. **Melanoma Res**, v. 14, n. 5, p. 345-351, 2004.

CHAURAND, P., LUETZENKIRCHEN, F., SPENGLER, B. Peptide and protein identification by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) and MALDI-post-source decay time-of-flight mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 10, n. 2, p. 91-103, Feb 1999.

CHEN, K. G., VALENCIA, J. C., GILLET, J.-P., HEARING, V. J., GOTTESMAN, M. M. Involvement of ABC transporters in melanogenesis and the development of multidrug resistance of melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 22, n. 6, p. 740-749, 2009.

CHEN, K. G., VALENCIA, J. C., LAI, B., ZHANG, G., PATERSON, J. K., ROUZAUD, F., BERENS, W., WINCOVITCH, S. M., GARFIELD, S. H., LEAPMAN, R. D., HEARING, V. J., GOTTESMAN, M. M. Melanosomal sequestration of cytotoxic drugs contributes to the intractability of malignant melanomas. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 26, p. 9903-9907, June 27, 2006 2006.

CHEN, Q. M., BARTHOLOMEW, J. C., CAMPISI, J., ACOSTA, M., REAGAN, J. D., AMES, B. N. Molecular analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. **Biochem J**, v. 332 ( Pt 1), p. 43-50, May 15 1998.

CHEN, X., ZHONG, Z., XU, Z., CHEN, L., WANG, Y. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. **Free Radical Research**, v. 44, n. 6, p. 587-604, 2010.

CHEN, Y., ZHENG, W., LI, Y., ZHONG, J., JI, J., SHEN, P. Apoptosis induced by methylene-blue-mediated photodynamic therapy in melanomas and the involvement of mitochondrial dysfunction revealed by proteomics. **Cancer Sci**, v. 99, n. 10, p. 2019-27, Oct 2008.

CHO, Y.-Y., TANG, F., YAO, K., LU, C., ZHU, F., ZHENG, D., PUGLIESE, A., BODE, A. M., DONG, Z. Cyclin-Dependent Kinase-3-Mediated c-Jun Phosphorylation at Ser63 and Ser73 Enhances Cell Transformation. **Cancer Research**, v. 69, n. 1, p. 272-281, January 1, 2009 2009.

CHRISTOFK, H. R., VANDER HEIDEN, M. G., HARRIS, M. H., RAMANATHAN, A., GERSZTEN, R. E., WEI, R., FLEMING, M. D., SCHREIBER, S. L., CANTLEY, L. C. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. **Nature**, v. 452, n. 7184, p. 230-233, 2008.

CIOCCA, D. R., CALDERWOOD, S. K. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. **Cell Stress Chaperones**, v. 10, n. 2, p. 86-103, Summer 2005.

CMIELOVA, J., HAVELEK, R., JIROUTOVA, A., KOHLEROVA, R., SEIFRTOVA, M., MUTHNA, D., VAVROVA, J., REZACOVA, M. DNA damage caused by ionizing radiation in embryonic diploid fibroblasts WI-38 induces both apoptosis and senescence. **Physiol Res**, v. 60, n. 4, p. 667-77, 2011.

ĆMIELOVÁ, J., ŘEZÁČOVÁ, M. Protein and its function based on a subcellular localization. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, n. 12, p. 3502-3506, 2011.

COLLADO, M., SERRANO, M. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 6, p. 472-476, 2006.

CULP, W. D., NEAL, R., MASSEY, R., EGEVAD, L., PISA, P., GARLAND, D. Proteomic Analysis of Tumor Establishment and Growth in the B16-F10 Mouse Melanoma Model. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 6, p. 1332-1343, 2006/06/01 2006.

DALLE-DONNE, I., ROSSI, R., GIUSTARINI, D., MILZANI, A., COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clin Chim Acta**, v. 329, n. 1-2, p. 23-38, Mar 2003.

DAVID, S. Detection of redox-based modification in two-dimensional electrophoresis proteomic separations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 349, n. 2, p. 455-462, 2006.

DAVIES, M. J. The oxidative environment and protein damage. **Biochim Biophys Acta**, v. 1703, n. 2, p. 93-109, Jan 17 2005.

DE OLIVEIRA, J. C., BRASSESCO, M. S., PEZUK, J. A., MORALES, A. G., VALERA, E. T., MONTALDI, A. P., SAKAMOTO-HOJO, E. T., SCRIDELI, C. A., TONE, L. G. In vitro PLK1 inhibition by BI 2536 decreases proliferation and induces cell-cycle arrest in melanoma cells. **J Drugs Dermatol**, v. 11, n. 5, p. 587-92, May 2012.

DE SOUZA, G. A., GODOY, L. M. F., TEIXEIRA, V. R., OTAKE, A. H., SABINO, A., ROSA, J. C., DINARTE, A. R., PINHEIRO, D. G., SILVA, W. A., EBERLIN, M. N., CHAMMAS, R., GREENE, L. J. Proteomic and SAGE profiling of murine melanoma progression indicates the reduction of proteins responsible for ROS degradation. **Proteomics**, v. 6, n. 5, p. 1460-1470, 2006.

DEBACQ-CHAINIAUX, F., ERUSALIMSKY, J. D., CAMPISI, J., TOUSSAINT, O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-[beta]gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. **Nat. Protocols**, v. 4, n. 12, p. 1798-1806, 2009.

DEWILDE, A., PELLIEUX, C., HAJJAM, S., WATTRE, P., PIERLOT, C., HOBER, D., AUBRY, J. M. Virucidal activity of pure singlet oxygen generated by thermolysis of a water-soluble naphthalene endoperoxide. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 36, n. 1, p. 23-29, Oct 1996.

DI MASCIIO, P., SIES, H. Quantification of Singlet Oxygen Generated by Thermolysis of 3,3'-(1,4-Naphthylidene)Dipropionate - Monomol and Dimol Photoemission and the Effects of 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]Octane. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, n. 8, p. 2909-2914, Apr 12 1989.

DIMENT, S., EIDELMAN, M., RODRIGUEZ, G. M., ORLOW, S. J. Lysosomal hydrolases are present in melanosomes and are elevated in melanizing cells. **J Biol Chem**, v. 270, n. 9, p. 4213-5, Mar 3 1995.

EL-DEIRY, W. S., HARPER, J. W., O'CONNOR, P. M., VELCULESCU, V. E., CANMAN, C. E., JACKMAN, J., PIETENPOL, J. A., BURRELL, M., HILL, D. E., WANG, Y., ET AL. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. **Cancer Res**, v. 54, n. 5, p. 1169-74, Mar 1 1994.

ELLEIDGE, S. J. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. **Science**, v. 274, n. 5293, p. 1664-72, Dec 6 1996.

FANTIN, V. R., ST-PIERRE, J., LEDER, P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. **Cancer Cell**, v. 9, n. 6, p. 425-434, 2006.

FERRARIO, A., GOMER, C. J. Targeting the 90 kDa heat shock protein improves photodynamic therapy. **Cancer Lett**, v. 289, n. 2, p. 188-94, Mar 28 2010.

FOSTER, D. A., YELLEN, P., XU, L., SAQCENA, M. Regulation of G1 Cell Cycle Progression: Distinguishing the Restriction Point from a Nutrient-Sensing Cell Growth Checkpoint(s). **Genes & Cancer**, v. 1, n. 11, p. 1124-1131, 2011.

FRIED, L., ARBISER, J. L. The reactive oxygen-driven tumor: relevance to melanoma. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 21, n. 2, p. 117-22, Apr 2008.

FU, Z., TINDALL, D. J. FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. **Oncogene**, v. 27, n. 16, p. 2312-9, Apr 7 2008.

FULLER, B. B., IMAN, D. S., LUNSFORD, J. B. Comparison of tyrosinase levels in amelanotic and melanotic melanoma cell cultures by a competitive enzyme-linked immunoadsorbent assay and by immunotitration analysis. **J Cell Physiol**, v. 134, n. 1, p. 149-54, Jan 1988.

FULLER, B. B., SPAULDING, D. T., SMITH, D. R. Regulation of the catalytic activity of preexisting tyrosinase in black and Caucasian human melanocyte cell cultures. **Exp Cell Res**, v. 262, n. 2, p. 197-208, Jan 15 2001.

GADJEVA, V., DIMOV, A., GEORGIEVA, N. Influence of therapy on the antioxidant status in patients with melanoma. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 33, n. 2, p. 179-185, 2008.

GARCIA-MOLINA, F., PETER ANTHONY GARCIA-RUIZ, N., GARCIA-CA, F., JOSEPH LOUIS MUNOZ-MUNOZ, J. T., MARY GARCIA-MOLINA, A. J. N. R.-L. Melanogenesis Inhibition Due to NADH. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 74, n. 9, p. 1777-1787, 2010.

GARNER, E., RAJ, K. Protective mechanisms of p53-p21-pRb proteins against DNA damage-induced cell death. **Cell Cycle**, v. 7, n. 3, p. 277-82, Feb 1 2008.

GILLIES, R. J., DIDIER, N., DENTON, M. Determination of cell number in monolayer cultures. **Analytical Biochemistry**, v. 159, n. 1, p. 109-113, 1986.

GOVINDARAJAN, B., SLIGH, J. E., VINCENT, B. J., LI, M., CANTER, J. A., NICKOLOFF, B. J., RODENBURG, R. J., SMEITINK, J. A., OBERLEY, L., ZHANG, Y., SLINGERLAND, J., ARNOLD, R. S., LAMBETH, J. D., COHEN, C., HILENSKI, L., GRIENDLING, K., MARTÍNEZ-DIEZ, M., CUEZVA, J. M., ARBISER, J. L. Overexpression of Akt converts radial growth melanoma to vertical growth melanoma. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 3, p. 719-729, 2007.

GRACANIN, M., HAWKINS, C. L., PATTISON, D. I., DAVIES, M. J. Singlet-oxygen-mediated amino acid and protein oxidation: formation of tryptophan peroxides and decomposition products. **Free Radic Biol Med**, v. 47, n. 1, p. 92-102, Jul 1 2009.

GRAHAM, D. R., ELLIOTT, S. T., VAN EYK, J. E. Broad-based proteomic strategies: a practical guide to proteomics and functional screening. **J Physiol**, v. 563, n. Pt 1, p. 1-9, Feb 15 2005.

GRUNEWALD, T. G. P., KAMMERER, U., WINKLER, C., SCHINDLER, D., SICKMANN, A., HONIG, A., BUTT, E. Overexpression of LASP-1 mediates migration and proliferation of human ovarian cancer cells and influences zyxin localisation. **Br J Cancer**, v. 96, n. 2, p. 296-305, 2007.

GUPTA, S., AHMAD, N., NIEMINEN, A. L., MUKHTAR, H. Growth inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate in androgen-sensitive and androgen-insensitive human prostate carcinoma cells. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 164, n. 1, p. 82-90, Apr 1 2000.

GUTTERIDGE, J. M., HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Ann N Y Acad Sci**, v. 899, p. 136-47, 2000.

HA, L., ICHIKAWA, T., ANVER, M., DICKINS, R., LOWE, S., SHARPLESS, N. E., KRIMPENFORT, P., DEPINHO, R. A., BENNETT, D. C., SVIDERSKAYA, E. V., MERLINO, G. ARF functions as a melanoma tumor suppressor by inducing p53-independent senescence. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 26, p. 10968-73, Jun 26 2007.

HADDAD, M. M., XU, W., SCHWAHN, D. J., LIAO, F., MEDRANO, E. E. Activation of a cAMP Pathway and Induction of Melanogenesis Correlate with Association of p16INK4 and p27KIP1 to CDKs, Loss of E2F-Binding Activity, and Premature Senescence of Human Melanocytes. **Experimental Cell Research**, v. 253, n. 2, p. 561-572, 1999.

HARPER, J. W., ELLEDGE, S. J., KEYOMARSI, K., DYNLACHT, B., TSAI, L. H., ZHANG, P., DOBROWOLSKI, S., BAI, C., CONNELL-CROWLEY, L., SWINDELL, E., ET AL. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. **Mol Biol Cell**, v. 6, n. 4, p. 387-400, Apr 1995.

HARTWELL, L., WEINERT, T., KADYK, L., GARVIK, B. Cell cycle checkpoints, genomic integrity, and cancer. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 59, p. 259-63, 1994.

HASHIMOTO, Y., ITO, Y., KATO, T., MOTOKAWA, T., KATAGIRI, T., ITOH, M. Expression profiles of melanogenesis-related genes and proteins in acquired melanocytic nevus. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 33, n. 3, p. 207-215, 2006.

HENGST, L., REED, S. I. Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. **Science**, v. 271, n. 5257, p. 1861-4, Mar 29 1996.

HILF, R. Mitochondria are targets of photodynamic therapy. **J Bioenerg Biomembr**, v. 39, n. 1, p. 85-9, Feb 2007.

HILL, H. Z., HILL, G. J. Eumelanin causes DNA strand breaks and kills cells. **Pigment Cell Res**, v. 1, n. 3, p. 163-70, 1987.

HO, A. D., S.F. Regulation of G(1) cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. **Curr Opin Genet Dev.**, v. 12, n. 1, p. 47-52, 2002.

HOOGDUIJN, M. J., CEMELI, E., ROSS, K., ANDERSON, D., THODY, A. J., WOOD, J. M. Melanin protects melanocytes and keratinocytes against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA strand breaks through its ability to bind Ca<sup>2+</sup>. **Experimental Cell Research**, v. 294, n. 1, p. 60-67, 2004.

HOPPER, C. Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. **Lancet Oncol**, v. 1, p. 212-9, Dec 2000.

HOSHINO, T., MATSUDA, M., YAMASHITA, Y., TAKEHARA, M., FUKUYA, M., MINEDA, K., MAJI, D., IHN, H., ADACHI, H., SOBUE, G., FUNASAKA, Y., MIZUSHIMA, T. Suppression of Melanin Production by Expression of HSP70. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 17, p. 13254-13263, April 23, 2010 2010.



HUANG, H. C., CHIU, S. H., CHANG, T. M. Inhibitory effect of [6]-gingerol on melanogenesis in B16F10 melanoma cells and a possible mechanism of action. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 75, n. 6, p. 1067-72, 2011.

ITO, S., WAKAMATSU, K., OZEKI, H. Chemical Analysis of Melanins and its Application to the Study of the Regulation of Melanogenesis. **Pigment Cell Research**, v. 13, p. 103-109, 2000.

IVRY, G. B., OGLE, C. A., SHIM, E. K. Role of Sun Exposure in Melanoma. **Dermatologic Surgery**, v. 32, n. 4, p. 481-492, 2006.

JENSEN, R. L., ARNBJERG, J., BIRKEDAL, H., OGILBY, P. R. Singlet oxygen's response to protein dynamics. **J Am Chem Soc**, v. 133, n. 18, p. 7166-73, May 11 2011.

JIMENEZ, M., KAMEYAMA, K., MALOY, W. L., TOMITA, Y., HEARING, V. J. Mammalian tyrosinase: biosynthesis, processing, and modulation by melanocyte-stimulating hormone. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 11, p. 3830-4, Jun 1988.

JOSHI, B., KO, D., ORDONEZ-ERCAN, D., CHELLAPPAN, S. P. A putative coiled-coil domain of prohibitin is sufficient to repress E2F1-mediated transcription and induce apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 312, n. 2, p. 459-66, Dec 12 2003.

JUARRANZ, Á., JAÉN, P., SANZ-RODRÍGUEZ, F., CUEVAS, J., GONZÁLEZ, S. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. **Clinical and Translational Oncology**, v. 10, n. 3, p. 148-154, 2008.

JUPE, E. R., LIU, X. T., KIEHLBAUCH, J. L., MCCLUNG, J. K., DELL'ORCO, R. T. Prohibitin antiproliferative activity and lack of heterozygosity in immortalized cell lines. **Exp Cell Res**, v. 218, n. 2, p. 577-80, Jun 1995.

KADEKARO, A. L., KAVANAGH, R. J., WAKAMATSU, K., ITO, S., PIPITONE, M. A., ABDEL-MALEK, Z. A. Cutaneous Photobiology. The Melanocyte vs. the Sun: Who Will Win the Final Round? **Pigment Cell Research**, v. 16, n. 5, p. 434-447, 2003.

KEIDING, R., HÖRDER, M., DENMARK, W. G., PITKÄNEN, E., TENHUNEN, R., STRÖMME, J. H., THEODORSEN, L., WALDENSTRÖM, J., TRYDING, N., WESTLUND, L. Recommended Methods for the Determination of Four Enzymes in Blood. **Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation**, v. 33, n. 4, p. 291-306, 1974.

KIPP, C., YOUNG, A. R. The Soluble Eumelanin Precursor 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylic Acid Enhances Oxidative Damage in Human Keratinocyte DNA after UVA Irradiation†. **Photochemistry and Photobiology**, v. 70, n. 2, p. 191-198, 1999.

KLOTZ, L. O., BRIVIBA, K., SIES, H. Mitogen-activated protein kinase activation by singlet oxygen and ultraviolet A. **Methods Enzymol**, v. 319, p. 130-43, 2000.

KLOTZ, L. O., FRITSCH, C., BRIVIBA, K., TSACMACIDIS, N., SCHLISS, F., SIES, H. Activation of JNK and p38 but not ERK MAP kinases in human skin cells by 5-aminolevulinate-photodynamic therapy. **Cancer Res**, v. 58, n. 19, p. 4297-300, Oct 1 1998.

KLOTZSCHE, O., ETZRODT, D., HOHENBERG, H., BOHN, W., DEPPERT, W. Cytoplasmic retention of mutant *tp53* is dependent on an intermediate filament protein (vimentin) scaffold. **Oncogene**, v. 16, n. 26, p. 3423-34, Jul 2 1998.

KOHEN, R., NYSKA, A. Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. **Toxicologic Pathology**, v. 30, n. 6, p. 620-650, October 1, 2002 2002.

KONGSHOJ, B., MIKKELSEN, N. D., KOBAYASI, T., LERCHE, C. M., WULF, H. C. Ammonium chloride and L-tyrosine enhance melanogenesis in vitro but not in vivo even in combination with ultraviolet radiation. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v. 23, n. 5, p. 197-202, Oct 2007.

KORNER, A., PAWELEK, J. Activation of melanoma tyrosinase by a cyclic AMP-dependent protein kinase in a cell-free system. **Nature**, v. 267, n. 5610, p. 444-7, Jun 2 1977.

KORYTOWSKI, W., PILAS, B., SARNA, T., KALYANARAMAN, B. PHOTOINDUCED GENERATION OF HYDROGEN PEROXIDE AND HYDROXYL RADICALS IN MELANINS. **Photochemistry and Photobiology**, v. 45, n. 2, p. 185-190, 1987.

KOSANO, H., KAYANUMA, T., NISHIGORI, H. Stimulation of melanogenesis in murine melanoma cells by 2-mercapto-1-(beta-4-pyridethyl) benzimidazole (MPB). **Biochim Biophys Acta**, v. 1499, n. 1-2, p. 11-18, Dec 11 2000.

KVAM, E., TYRRELL, R. M. The Role of Melanin in the Induction of Oxidative DNA Base Damage by Ultraviolet A Irradiation of DNA or Melanoma Cells. **J Invest Dermatol**, v. 113, n. 2, p. 209-213, 1999.

KWON, Y. H., JOVANOVIC, A., SERFAS, M. S., KIYOKAWA, H., TYNER, A. L. p21 Functions to Maintain Quiescence of p27-deficient Hepatocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 44, p. 41417-41422, November 1, 2002 2002.

LANE, C. S. Mass spectrometry-based proteomics in the life sciences. **Cell Mol Life Sci**, v. 62, n. 7-8, p. 848-69, Apr 2005.

LAPORTE, D., LEBAUDY, A., SAHIN, A., PINSON, B., CESCHIN, J., DAIGNAN-FORNIER, B., SAGOT, I. Metabolic status rather than cell cycle signals control quiescence entry and exit. **The Journal of Cell Biology**, v. 192, n. 6, p. 949-957, March 21, 2011 2011.

LEI, T., HE, Q.-Y., CAI, Z., ZHOU, Y., WANG, Y.-L., SI, L.-S., CAI, Z., CHIU, J.-F. Proteomic analysis of chromium cytotoxicity in cultured rat lung epithelial cells. **Proteomics**, v. 8, n. 12, p. 2420-2429, 2008.

LIU, H. Y., LENG, J. H., SUN, D. W., ZHU, L., LIU, Z. F., LANG, J. H., WANG, X. R., WU, S. Z. [Comparative proteomics analysis of human adenomyosis]. **Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi**, v. 43, n. 7, p. 514-7, Jul 2008.

LIU, K. S., DING, W. C., WANG, S. X., LIU, Z., XING, G. W., WANG, Y., WANG, Y. F. The heat shock protein 90 inhibitor SNX-2112 inhibits B16 melanoma cell growth in vitro and in vivo. **Oncol Rep**, v. 27, n. 6, p. 1904-10, Jun 2012.

LIU, Y., HE, J., JI, S., WANG, Q., PU, H., JIANG, T., MENG, L., YANG, X., JI, J. Comparative Studies of Early Liver Dysfunction in Senescence-accelerated Mouse Using Mitochondrial Proteomics Approaches. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 7, n. 9, p. 1737-1747, September 2008 2008.

LÜ, Z.-R., SEO, E., YAN, L., YIN, S.-J., SI, Y.-X., QIAN, G.-Y., PARK¶, Y.-D., YANG, J.-M. High-throughput integrated analyses for the tyrosinase-induced melanogenesis: microarray, proteomics and interactomics studies. **J Biomol Struct Dyn.**, v. 28, n. 2, p. 259-276, 2010.

LUNEC, J., HOLLOWAY, K. A., COOKE, M. S., FAUX, S., GRIFFITHS, H. R., EVANS, M. D. Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine: redox regulation of DNA repair in vivo? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 7, p. 875-885, 2002.

M MEYERSON, G. H. E., C L WU, L K SU, C GORKA, C NELSON, E HARLOW, AND L H TSAI. A family of human cdc2-related protein kinases. **Embo J.** , v. 11, n. 8, p. 2909-2917, 1992.

MACIP, S., IGARASHI, M., BERGGREN, P., YU, J., LEE, S. W., AARONSON, S. A. Influence of induced reactive oxygen species in p53-mediated cell fate decisions. **Mol Cell Biol**, v. 23, n. 23, p. 8576-85, Dec 2003.

MAGI, B., ETTORRE, A., LIBERATORI, S., BINI, L., ANDREASSI, M., FROSALI, S., NERI, P., PALLINI, V., DI STEFANO, A. Selectivity of protein carbonylation in the apoptotic response to oxidative stress associated with photodynamic therapy: a cell biochemical and proteomic investigation. **Cell Death Differ**, v. 11, n. 8, p. 842-52, Aug 2004.

MARESCA, V., FLORI, E., BRIGANTI, S., MASTROFRANCESCO, A., FABBRI, C., MILEO, A. M., PAGGI, M. G., PICARDO, M. Correlation between melanogenic and catalase activity in in vitro human melanocytes: a synergic strategy against oxidative stress. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 21, n. 2, p. 200-205, 2008.

MARIO, P. Proteomics: The next revolution in laboratory medicine? **Clinica Chimica Acta**, v. 357, n. 2, p. 113-122, 2005.

MARLES, L. K., PETERS, E. M., TOBIN, D. J., HIBBERTS, N. A., SCHALLREUTER, K. U. Tyrosine hydroxylase isoenzyme I is present in human melanosomes: a possible novel function in pigmentation. **Exp Dermatol**, v. 12, n. 1, p. 61-70, Feb 2003.

MARROT, L., BELAIDI, J.-P., MEUNIER, J.-R., PEREZ, P., AGAPAKIS-CAUSSE, C. The Human Melanocyte as a Particular Target for UVA Radiation and an Endpoint for Photoprotection Assessment. **Photochemistry and Photobiology**, v. 69, n. 6, p. 686-693, 1999.

MARTINEZ, G. R., RAVANAT, J.-L., MEDEIROS, M. H. G., CADET, J., DI MASCIO, P. Synthesis of a Naphthalene Endoperoxide as a Source of <sup>18</sup>O-labeled Singlet Oxygen for Mechanistic Studies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 41, p. 10212-10213, 2000/10/01 2000.

MATÉS, J. M., SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. M. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 32, n. 2, p. 157-170, 2000.

MATSUOKA, S., EDWARDS, M. C., BAI, C., PARKER, S., ZHANG, P., BALDINI, A., HARPER, J. W., ELLEDGE, S. J. p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. **Genes Dev**, v. 9, n. 6, p. 650-62, Mar 15 1995.

MAYER, M. P., BUKAU, B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. **Cell Mol Life Sci**, v. 62, n. 6, p. 670-84, Mar 2005.

MEERAN, S. M., KATIIYAR, S. K. Grape seed proanthocyanidins promote apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells through alterations in Cdk1-Cdk-cyclin cascade, and caspase-3 activation via loss of mitochondrial membrane potential. **Exp Dermatol**, v. 16, n. 5, p. 405-15, May 2007.

MEREDITH, P., SARNA, T. The physical and chemical properties of eumelanin. **Pigment Cell Research**, v. 19, n. 6, p. 572-594, 2006.

MILLA, L. N., COGNO, I. S., RODRIGUEZ, M. E., SANZ-RODRIGUEZ, F., ZAMARRON, A., GILABERTE, Y., CARRASCO, E., RIVAROLA, V. A., JUARRANZ, A. Isolation and characterization of squamous carcinoma cells resistant to photodynamic therapy. **J Cell Biochem**, v. 112, n. 9, p. 2266-78, Sep 2011.

MILLER, A. J., MIHM, M. C. Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 1, p. 51-65, 2006.

MOOI, W. J., PEEPER, D. S. Oncogene-Induced Cell Senescence — Halting on the Road to Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 10, p. 1037-1046, 2006.

MORGAN, P. E., DEAN, R. T., DAVIES, M. J. Protective mechanisms against peptide and protein peroxides generated by singlet oxygen. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, n. 4, p. 484-496, 2004.

MORIMOTO, R. I., SANTORO, M. G. Stress-inducible responses and heat shock proteins: New pharmacologic targets for cytoprotection. **Nat Biotech**, v. 16, n. 9, p. 833-838, 1998.

MURRAY, A. Cell cycle checkpoints. **Curr Opin Cell Biol**, v. 6, n. 6, p. 872-6, Dec 1994.

NAJMAN, H., GADELHA, M. I. P. Termozolamida. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 48, n. 3, p. 439-445, 2002.

NAPPI, A. J., VASS, E. . Hydrogen peroxide generation associated with the oxidation of the eumelanogenic precursor 5,6-dihydroxyindole and 5,6 dihydroxyindole-2-carboxylic acid. **Melanoma Res**, v. 6, n. 5, p. 341-349, 1996.

NAWARAK, J., HUANG-LIU, R., KAO, S.-H., LIAO, H.-H., SINCHAIKUL, S., CHEN, S.-T., CHENG, S.-L. Proteomics Analysis of Kojic Acid Treated A375 Human Malignant Melanoma Cells. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 9, p. 3737-3746, 2008/09/05 2008.

NECKERS, L. Heat shock protein 90: The cancer chaperone. **Journal of Biosciences (Bangalore)**, v. 32, n. 3, p. 517-530, 2007.

NOGUCHI, S., MORI, T., OTSUKA, Y., YAMADA, N., YASUI, Y., IWASAKI, J., KUMAZAKI, M., MARUO, K., AKAO, Y. Anti-oncogenic microRNA-203 induces senescence by targeting E2F3 protein in human melanoma cells. **J Biol Chem**, v. 287, n. 15, p. 11769-77, Apr 6 2012.

NOIVA, R., LENNARZ, W. J. Protein disulfide isomerase. A multifunctional protein resident in the lumen of the endoplasmic reticulum. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 6, p. 3553-3556, February 25, 1992 1992.

NORBURY, C., NURSE, P. Animal cell cycles and their control. **Annu Rev Biochem**, v. 61, p. 441-70, 1992.

OIKAWA, A., SAEKI, H., AKIYAMA, T., MATSUMOTO, J. Electron microscopic evidence for stimulation of melanosomal maturation by lysosomotropic agents and monensin in cultured B16 mouse melanoma cells. **Pigment Cell Res**, v. 1, n. 1, p. 44-50, 1987.

ORTIZ, P. A., KINZY, T. G. Dominant-negative mutant phenotypes and the regulation of translation elongation factor 2 levels in yeast. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 18, p. 5740-8, 2005.

OSSOWSKI, L., AGUIRRE-GHISO, J. A. Dormancy of metastatic melanoma. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 23, n. 1, p. 41-56, Feb 2010.

OTSU, K., SATO, K., IKEDA, Y., IMAI, H., NAKAGAWA, Y., OHBA, Y., FUJII, J. An abortive apoptotic pathway induced by singlet oxygen is due to the suppression of caspase activation. **Biochem J**, v. 389, n. Pt 1, p. 197-206, Jul 1 2005.

OTSU, K., SATO, K., SATO, M., ONO, H., OHBA, Y., KATAGATA, Y. Impaired activation of caspase cascade during cell death induced by newly synthesized singlet oxygen generator, 1-buthylnaphthalene-4-propionate endoperoxide. **Cell Biol Int**, v. 32, n. 11, p. 1380-7, Nov 2008.

PAN, J. S., HONG, M. Z., REN, J. L. Reactive oxygen species: a double-edged sword in oncogenesis. **World J Gastroenterol**, v. 15, n. 14, p. 1702-7, Apr 14 2009.

PAPPAS, C. T., BLISS, K. T., ZIESENISS, A., GREGORIO, C. C. The Nebulin family: an actin support group. **Trends Cell Biol**, v. 21, n. 1, p. 29-37, Jan 2011.

PARON, I., D'ELIA, A., D'AMBROSIO, C., SCALONI, A., D'AURIZIO, F., PRESCOTT, A., DAMANTE, G., TELL, G. A proteomic approach to identify early molecular targets of oxidative stress in human epithelial lens cells. **Biochem. J.**, v. 378, n. 3, p. 929-937, Mar 15, 2004 2004.

PASSOS, J. F., NELSON, G., WANG, C., RICHTER, T., SIMILLION, C., PROCTOR, C. J., MIWA, S., OLIJSLAGERS, S., HALLINAN, J., WIPAT, A., SARETZKI, G., RUDOLPH, K. L., KIRKWOOD, T. B., VON ZGLINICKI, T. Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. **Mol Syst Biol**, v. 6, p. 347, 2010.

PAVEL, S., VAN NIEUWPOORT, F., VAN DER MEULEN, H., OUT, C., PIZINGER, K., CETKOVSKÁ, P., SMIT, N. P. M., KOERTEN, H. K. Disturbed melanin synthesis and chronic oxidative stress in dysplastic naevi. **European Journal of Cancer**, v. 40, n. 9, p. 1423-1430, 2004.

PERKINS, D. N., PAPPIN, D. J., CREASY, D. M., COTTRELL, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, v. 20, n. 18, p. 3551-67, Dec 1999.

PERL, A., HANCZKO, R., TELARICO, T., OAKS, Z., LANDAS, S. Oxidative stress, inflammation and carcinogenesis are controlled through the pentose phosphate pathway by transaldolase. **Trends in Molecular Medicine**, v. 17, n. 7, p. 395-403, 2011.

PERONA, R., SANCHEZ-PEREZ, I. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance. **Br J Cancer**, v. 90, n. 3, p. 573-7, Feb 9 2004.

PERUCCA, P., CAZZALINI, O., MADINE, M., SAVIO, M., LASKEY, R. A., VANNINI, V., PROSPERI, E., STIVALA, L. A. Loss of p21<sup>CDKN1A</sup> impairs entry to quiescence and activates a DNA damage response in normal fibroblasts induced to quiescence. **Cell Cycle**, v. 8, n. 1, p. 105-114, 2009.

PEY, A. L., MARTINEZ, A., CHARUBALA, R., MAITLAND, D. J., TEIGEN, K., CALVO, A., PFLEIDERER, W., WOOD, J. M., SCHALLREUTER, K. U. Specific interaction of the diastereomers 7(R)- and 7(S)-tetrahydrobiopterin with phenylalanine hydroxylase: implications for understanding primapterinuria and vitiligo. **Faseb Journal**, v. 20, n. 12, p. 2130-2, Oct 2006.

PIERLOT, C., AUBRY, J. M., BRIVIBA, K., SIES, H., DI MASCIO, P. Naphthalene endoperoxides as generators of singlet oxygen in biological media. **Singlet Oxygen, Uv-a, and Ozone**, v. 319, p. 3-20, 2000.

PIERLOT, C., AUBRY, J. M., BRIVIBA, K., SIES, H., DI MASCIIO P. Naphthalene endoperoxides as generators of singlet oxygen in biological media. **Methods Enzymol.**, v. 319, p. 3-20, 2000.

PINON, A., LIMAMI, Y., MICALLEF, L., COOK-MOREAU, J., LIAGRE, B., DELAGE, C., DUVAL, R. E., SIMON, A. A novel form of melanoma apoptosis resistance: Melanogenesis up-regulation in apoptotic B16-F0 cells delays ursolic acid-triggered cell death. **Experimental Cell Research**, v. 317, n. 12, p. 1669-1676, 2011.

POLSKY, D., YOUNG, A. Z., BUSAM, K. J., ALANI, R. M. The transcriptional repressor of p16/Ink4a, Id1, is up-regulated in early melanomas. **Cancer Res**, v. 61, n. 16, p. 6008-11, Aug 15 2001.

POWERS, M. V., WORKMAN, P. Targeting of multiple signalling pathways by heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitors. **Endocrine-Related Cancer**, v. 13, n. Supplement 1, p. S125-S135, December 1, 2006 2006.

PRASAD, S., SOLDATENKOV, V. A., SRINIVASARAO, G., DRITSCHILO, A. Intermediate filament proteins during carcinogenesis and apoptosis (Review). **Int J Oncol**, v. 14, n. 3, p. 563-70, Mar 1999.

PRENSNER, J. R., CHINNAIYAN, A. M. Metabolism unhinged: IDH mutations in cancer. **Nat Med**, v. 17, n. 3, p. 291-293, 2011.

RABILLOUD, T., CHEVALLET, M., LUCHE, S., LELONG, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. **J Proteomics**, v. 73, n. 11, p. 2064-77, Oct 10 2010.

RASTOGI, S., JOSHI, B., DASGUPTA, P., MORRIS, M., WRIGHT, K., CHELLAPPAN, S. Prohibitin Facilitates Cellular Senescence by Recruiting Specific Corepressors To Inhibit E2F Target Genes. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 11, p. 4161-4171, June 1, 2006 2006.

RAVANAT, J.-L., DI MASCIIO, P., MARTINEZ, G. R., MEDEIROS, M. H. G., CADET, J. Singlet Oxygen Induces Oxidation of Cellular DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 51, p. 40601-40604, December 22, 2000 2000.

REDLITZ, A., FOWLER, B. J., PLOW, E. F., MILES, L. A. The role of an enolase-related molecule in plasminogen binding to cells. **Eur J Biochem**, v. 227, n. 1-2, p. 407-15, Jan 15 1995.

REES, J. L. Melanoma: What Are the Gaps in Our Knowledge? **PLoS Med**, v. 5, n. 6, p. e122, 2008.

REILLY, T. P., BELLEVUE III, F. H., WOSTER, P. M., SVENSSON, C. K. Comparison of the In Vitro Cytotoxicity of Hydroxylamine Metabolites of Sulfamethoxazole and Dapsone. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, n. 6, p. 803-810, 1998.

RIEBER, M. S., RIEBER, M. Specific tyrosinases associated with melanoma replicative senescence and melanogenesis. **Cancer Res**, v. 53, n. 11, p. 2469-71, Jun 1 1993.

RILEY, P. A. Melanogenesis and melanoma. **Pigment Cell Res**, v. 16, n. 5, p. 548-52, Oct 2003.

RIVARD, N., L'ALLEMAIN, G., BARTEK, J., POUYSSEGUR, J. Abrogation of p27Kip1 by cDNA antisense suppresses quiescence (G0 state) in fibroblasts. **J Biol Chem**, v. 271, n. 31, p. 18337-41, Aug 2 1996.

ROESCH, A., FUKUNAGA-KALABIS, M., SCHMIDT, E. C., ZABIEROWSKI, S. E., BRAFFORD, P. A., VULTUR, A., BASU, D., GIMOTTY, P., VOGT, T., HERLYN, M. A Temporarily Distinct Subpopulation of Slow-Cycling Melanoma Cells Is Required for Continuous Tumor Growth. **Cell**, v. 141, n. 4, p. 583-594, 2010.

ROSENKRANZ, A. R., SCHMALDIENST, S., STUHLMEIER, K. M., CHEN, W., KNAPP, W., ZLABINGER, G. J. A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate. **Journal of Immunological Methods**, v. 156, n. 1, p. 39-45, 1992.

SAEKI, H., OIKAWA, A. Stimulation of tyrosinase activity of cultured melanoma cells by lysosomotropic agents. **J Cell Physiol**, v. 116, n. 1, p. 93-7, Jul 1983.

SALI, A., GLAESER, R., EARNEST, T., BAUMEISTER, W. From words to literature in structural proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 216-225, 2003.

SAROSI, L. A. G., RIEBER, M. S., RIEBER, M. Hydrogen peroxide increases a 55-kDa tyrosinase concomitantly with induction of p53-dependent p21 waf1 expression and a greater Bax/Bcl-2 ratio in pigmented melanoma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 312, n. 2, p. 355-359, 2003.

SCHALLREUTER, K. U., KOTHARI, S., CHAVAN, B., SPENCER, J. D. Regulation of melanogenesis--controversies and new concepts. **Exp Dermatol**, v. 17, n. 5, p. 395-404, May 2008.

SCHALLREUTER, K. U., WOOD, J. M. The importance of L-phenylalanine transport and its autocrine turnover to L-tyrosine for melanogenesis in human epidermal melanocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 262, n. 2, p. 423-8, Aug 27 1999.

SEALY R. C., F. C. C., HYDE J. S. AND SWARTZ H. M. . Structure and reactivity of melanins: influence of free radicals and metal ions. . **Free Radical in Biology**, v. 4, p. 209-259, 1980.

SGAMBATO, A., CITTADINI, A., FARAGLIA, B., WEINSTEIN, I. B. Multiple functions of p27(Kip1) and its alterations in tumor cells: a review. **J Cell Physiol**, v. 183, n. 1, p. 18-27, Apr 2000.

SHAPIRO, H. M. Flow cytometric estimation of DNA and RNA content in intact cells stained with hoechst 33342 and pyronin Y. **Cytometry**, v. 2, n. 3, p. 143-150, 1981.



SHEIKH, M. S., FORNACE, A. J. Death and decoy receptors and p53-mediated apoptosis. **Leukemia**, v. 14, n. 8, p. 1509-1513, 2000.

SHERR, C. J. Cancer cell cycles. **Science**, v. 274, n. 5293, p. 1672-7, Dec 6 1996.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SINHA, P., POLAND, J., KOHL, S., SCHNÖLZER, M., HELMBACH, H., HÜTTER, G., LAGE, H., SCHADENDORF, D. Study of the development of chemoresistance in melanoma cell lines using proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 24, n. 14, p. 2386-2404, 2003.

Skin Cancer Information. v. 2012. n. 09/05: FOUNDATION SKIN CANCER 2012.

SLOMINSKI, A., TOBIN, D. J., SHIBAHARA, S., WORTSMAN, J. Melanin Pigmentation in Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 4, p. 1155-1228, October 1, 2004 2004.

SLOMINSKI, A., ZBYTEK, B., SLOMINSKI, R. Inhibitors of melanogenesis increase toxicity of cyclophosphamide and lymphocytes against melanoma cells. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 6, p. 1470-1477, 2009.

SNYDER, J. R., HALL, A., NI-KOMATSU, L., KHERSONSKY, S. M., CHANG, Y.-T., ORLOW, S. J. Dissection of Melanogenesis with Small Molecules Identifies Prohibitin as a Regulator. **Chemistry & Biology**, v. 12, n. 4, p. 477-484, 2005.

SON, Y.-O., LEE, K.-Y., LEE, J.-C., JANG, H.-S., KIM, J.-G., JEON, Y.-M., JANG, Y.-S. Selective antiproliferative and apoptotic effects of flavonoids purified from *Rhus verniciflua* Stokes on normal versus transformed hepatic cell lines. **Toxicology Letters**, v. 155, n. 1, p. 115-125, 2005.

SPENCER, J. D., GIBBONS, N. C. J., ROKOS, H., PETERS, E. M. J., WOOD, J. M., SCHALLREUTER, K. U. Oxidative Stress Via Hydrogen Peroxide Affects Proopiomelanocortin Peptides Directly in the Epidermis of Patients with Vitiligo. **J Invest Dermatol**, v. 127, n. 2, p. 411-420, 2006.

STEIN, G. H., DRULLINGER, L. F., SOULARD, A., DULIĆ, V. Differential Roles for Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors p21 and p16 in the Mechanisms of Senescence and Differentiation in Human Fibroblasts. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 3, p. 2109-2117, March 1, 1999 1999.

SUZUKAWA, A. A., VIEIRA, A., WINNISCHOFER, S. M. B., SCALFO, A. C., DI MASCIO, P., FERREIRA, A. M. D. C., RAVANAT, J.-L., MARTINS, D. D. L., ROCHA, M. E. M., MARTINEZ, G. R. Novel properties of melanins include promotion of DNA strand breaks, impairment of repair, and reduced ability to damage DNA after quenching of singlet oxygen. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 9, p. 1945-1953, 2012.

SUZUKI, A., IIZUKA, A., KOMIYAMA, M., TAKIKAWA, M., KUME, A., TAI, S., OHSHITA, C., KURUSU, A., NAKAMURA, Y., YAMAMOTO, A., YAMAZAKI, N., YOSHIKAWA, S., KIYOHARA, Y., AKIYAMA, Y. Identification of Melanoma Antigens Using a Serological Proteome Approach (SERPA). **Cancer Genomics - Proteomics**, v. 7, n. 1, p. 17-23, January-February 2010 2010.

SZATROWSKI, T. P., NATHAN, C. F. Production of Large Amounts of Hydrogen Peroxide by Human Tumor Cells. **Cancer Research**, v. 51, n. 3, p. 794-798, February 1, 1991 1991.

TAO CHENG, N. R., DAVID DOMBKOWSKI, SEBASTIAN STIER & DAVID T. SCADDEN. Stem cell repopulation efficiency but not pool size is governed by p27kip1. **Nature Medicine**, v. 6, p. 1235-1240, 2000.

TAO, W., LEVINE, A. J. P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 12, p. 6937-41, Jun 8 1999.

TIAN, J. Q., QUARONI, A. Involvement of p21(WAF1/Cip1) and p27(Kip1) in intestinal epithelial cell differentiation. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 276, n. 6, p. C1245-C1258, June 1, 1999 1999.

TSAI, J. C., WU, C. L., CHIEN, H. F., CHEN, C. T. Reorganization of cytoskeleton induced by 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy and its correlation with mitochondrial dysfunction. **Lasers Surg Med**, v. 36, n. 5, p. 398-408, Jun 2005.

TYRRELL, R. M. The molecular and cellular pathology of solar ultraviolet radiation. **Mol Aspects Med**, v. 15, n. 1, p. 1-77, 1994.

VAN DEN HEUVEL, S., HARLOW, E. Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. **Science**, v. 262, n. 5142, p. 2050-2054, December 24, 1993 1993.

VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., DE PAEPE, A., SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. research0034.1 - research0034.11, 2002.

VAVROVA, J., REZACOVA, M. The importance of senescence in ionizing radiation-induced tumour suppression. **Folia Biol (Praha)**, v. 57, n. 2, p. 41-6, 2011.

VERCAUTEREN, F. G., ARCKENS, L., QUIRION, R. Applications and current challenges of proteomic approaches, focusing on two-dimensional electrophoresis. **Amino Acids**, v. 33, n. 3, p. 405-14, Sep 2007.

VURUSANER, B., POLI, G., BASAGA, H. Tumor suppressor genes and ROS: complex networks of interactions. **Free Radic Biol Med**, v. 52, n. 1, p. 7-18, Jan 1 2012.

WANG, F., OSAWA, T., TSUCHIDA, R., YUASA, Y., SHIBUYA, M. Downregulation of receptor for activated C-kinase 1 (RACK1) suppresses tumor growth by inhibiting tumor cell proliferation and tumor-associated angiogenesis. **Cancer Science**, v. 102, n. 11, p. 2007-2013, 2011.

WANG, J., BAO, N., PARIS, L. L., GEAHLEN, R. L., LU, C. Total Internal Reflection Fluorescence Flow Cytometry. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 24, p. 9840-9844, 2008/12/15 2008.

WANG, N., STAMENOVIC, D. Mechanics of vimentin intermediate filaments. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 23, n. 5, p. 535-540, 2002.

WARD, L. S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 46, n. 4, 2002.

WEINBERG, E. D. Cellular Iron Metabolism in Health and Disease. **Drug Metabolism Reviews**, v. 22, n. 5, p. 531-579, 1990.

WEISHAUP, K. R., GOMER, C. J., DOUGHERTY, T. J. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. **Cancer Res**, v. 36, n. 7 PT 1, p. 2326-9, Jul 1976.

WILLIAMS, K. R., STONE, K. L. Enzymatic cleavage and HPLC peptide mapping of proteins. **Molecular Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 155-67, 1997.

WOLTER, F., AKOGLU, B., CLAUSNITZER, A., STEIN, J. Downregulation of the cyclin D1/Cdk4 complex occurs during resveratrol-induced cell cycle arrest in colon cancer cell lines. **J Nutr**, v. 131, n. 8, p. 2197-203, Aug 2001.

WOOD, J. M., CHAVAN, B., HAFEEZ, I., SCHALLREUTER, K. U. Regulation of tyrosinase by tetrahydropteridines and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 325, n. 4, p. 1412-1417, 2004.

WRIGHT, A., BUBB, W. A., HAWKINS, C. L., DAVIES, M. J. Singlet oxygen-mediated protein oxidation: evidence for the formation of reactive side chain peroxides on tyrosine residues. **Photochem Photobiol**, v. 76, n. 1, p. 35-46, Jul 2002.

YANG, X., WANG, J., LIU, C., GRIZZLE, W. E., YU, S., ZHANG, S., BARNES, S., KOOPMAN, W. J., MOUNTZ, J. D., KIMBERLY, R. P., ZHANG, H.-G. Cleavage of p53-Vimentin Complex Enhances Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Mediated Apoptosis of Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. **The American Journal of Pathology**, v. 167, n. 3, p. 705-719, 2005.

ZAIDI, M. R., DAY, C.-P., MERLINO, G. From UVs to Metastases: Modeling Melanoma Initiation and Progression in the Mouse. **J Invest Dermatol**, v. 128, n. 10, p. 2381-2391, 2008.

ZETTERBERG A, L. O., WIMAN KG. What is the restriction point? **Curr Opin Cell Biol.** , v. 7, n. 6, p. 835-842, 1995.

## ANEXOS

Atividades Complementares realizadas durante o doutorado

### Participação em cursos:

- Escrita de Artigos Científicos: Estruturação e Técnicas de Linguagem - Coordenação: Prof. Dr. Valtencir Zucolotto (Instituto de Física – USP/São Carlos) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Paraná, setembro/2010 (15 h).
- Curso Proteômica Quantitativa - Coordenação: Prof. Dr. Fábio Gozzo (Instituto de Química – UNICAMP) – III Congresso da Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas – BrMass, em Campinas, SP – 12 - 15 de dezembro/2009 (8 h).
- Curso Metaloproteínas: Estrutura, Espectroscopia e Reatividade - Coordenação: Profs. Drs. Pio Colepicolo e Ana Maria Ferreira (Instituto de Química – USP) – 30 h – set/2009.

### Participação em congressos:

- 14th Congress of the European Society of Photobiology com o trabalho intitulado: “Cellular effects of melanogenesis stimulus in melanoma cells - above and beyond melanin synthesis”, em Genebra. Suíça – setembro/2011.
- Congresso Internacional “Free Radicals and Antioxidants” com o trabalho intitulado “Treatment of melanocytes with singlet oxygen can induce expression of genes with the same pattern of melanoma cells”, em São Pedro, Brasil – agosto/2011.
- XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Celular – SBBq com o trabalho intitulado “Cellular Effects of Melanogenesis Stimulus in Melanoma Cells Revealed by Proteomics”, em Foz do Iguaçu, PR – abril/2011.
- I Workshop de Proteômica – Laboratório Nacional de Biociências – Campinas, SP – setembro/2010 (15 h).
- XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Celular – SBBq com o trabalho intitulado “Proteomic Analyses of B16-F10 cells treated with

singlet oxygen after stimulation of melanogenesis”, em Foz do Iguaçu, PR – 18-21 de maio/2010.

- III Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas – BrMass com o trabalho intitulado “Comparative Proteomic Analyses by MALDI-TOF profiling of murine melanocytes and melanoma cells treated with singlet molecular oxygen”, em Campinas, SP – 12-15 de dezembro/2009.
- Congresso Internacional “Free Radicals and Antioxidants” com o trabalho intitulado “Proteomic Analyses of Murine Melanocytes and melanoma cells treated with singlet molecular oxygen”, em Santiago, Chile - setembro/2009.

### **Premiações:**

- Travel Award – resumo do trabalho intitulado "Treatment of melanocytes with singlet oxygen can induce expression of genes with the same pattern of melanoma cells" - VII Meeting of South American Group of the SFRBM, South American Group of the SFRBM – agosto/2011.
- Melhor pôster do III Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas – BrMass com o trabalho intitulado “Comparative Proteomic Analyses by MALDI-TOF profiling of murine melanocytes and melanoma cells treated with singlet molecular oxygen”, em Campinas, SP – 12-15 de dezembro/2009.

### **Participação em bancas:**

- Monografia do curso em especialização em Biotecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (2009). Aluna: Elen Cristina da Silva Gonçalves Varela, com monografia intitulada: “A Biotecnologia dos alimentos transgênicos”.
- Avaliação de trabalhos de iniciação científica durante o 18º Evento de Iniciação Científica da UFPR (Evinci - 2010). Área de conhecimento: Bioquímica.

**Organização de eventos:**

- Comissão Organizadora – II Curso de Inverno de Bioquímica e Biologia Molecular – Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica (UFPR) - 18-22 julho/2011 (40 h).
- Comissão Organizadora – I Curso de Inverno de Bioquímica e Biologia Molecular – Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica (UFPR) - 26-30 julho/2010 (40 h).

**Orientação:**

- Co-orientação de Trabalho de Conclusão de Curso – Farmácia e Bioquímica – UFPR – 2011. Aluna Rebecca Kawahara. Monografia: “Análise de Bioinformática e validação de dados em proteômica no modelo de estímulo da melanogênese em células B16-F10”.

**Ensino:**

- Auxílio didático-científico no mini-curso “Introdução ao Laboratório de Oxidações Biológicas: Espécies reativas, câncer, atividade leishmanicida de polissacarídeos e metabolismo mitocondrial” durante o I Curso de Inverno de Bioquímica e Biologia Molecular – Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica (UFPR) - 26-30 julho/2010 (12 h).
- Auxílio didático-científico no mini-curso “Introdução à Análise Proteômica: Princípios e Aplicações” durante o I Curso de Inverno de Bioquímica e Biologia Molecular – Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica (UFPR) - 26-30 julho/2010 (12 h).

**Representação discente:**

- Representante Discente Titular no Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica da UFPR no período de setembro/2010 a agosto/2011.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>

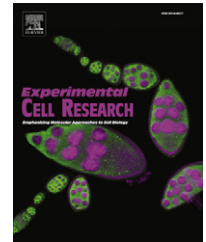




Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yexcr](http://www.elsevier.com/locate/yexcr)



## Research Article

# Melanogenesis stimulation in B16-F10 melanoma cells induces cell cycle alterations, increased ROS levels and a differential expression of proteins as revealed by proteomic analysis

Elizabeth S. Cunha<sup>a</sup>, Rebeca Kawahara<sup>a</sup>, Marina K. Kadowaki<sup>b</sup>, Hudson G. Amstalden<sup>a</sup>, Guilhermina R. Noletto<sup>a</sup>, Silvia Maria S.C. Cadena<sup>a</sup>, Sheila M.B. Winnischofer<sup>a</sup>, Glaucia R. Martinez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, P.O. Box 19046, CEP 81531-990, Curitiba, PR, Brazil

<sup>b</sup>Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR, Brazil

## ARTICLE INFORMATION

### Article Chronology:

Received 7 February 2012

Received in revised form

26 April 2012

Accepted 16 May 2012

Available online 2 June 2012

### Keywords:

Melanin

Melanogenesis

Cell cycle

Melanoma

ROS

## ABSTRACT

Considering that stimulation of melanogenesis may lead to alterations of cellular responses, besides melanin production, our main goal was to study the cellular effects of melanogenesis stimulation of B16-F10 melanoma cells. Our results show increased levels of the reactive oxygen species after 15 h of melanogenesis stimulation. Following 48 h of melanogenesis stimulation, proliferation was inhibited (by induction of cell cycle arrest in the G1 phase) and the expression levels of p21 mRNA were increased. In addition, melanogenesis stimulation did not induce cellular senescence. Proteomic analysis demonstrated the involvement of proteins from other pathways besides those related to the cell cycle, including protein disulfide isomerase A3, heat-shock protein 70, and fructose biphosphate aldolase A (all up-regulated), and lactate dehydrogenase (down-regulated). In RT-qPCR experiments, the levels of pyruvate kinase M2 mRNA dropped, whereas the levels of ATP synthase (beta-F1) mRNA increased. These data indicate that melanogenesis stimulation of B16-F10 cells leads to alterations in metabolism and cell cycle progression that may contribute to an induction of cell quiescence, which may provide a mechanism of resistance against cellular injury promoted by melanin synthesis.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Introduction

Skin contains the pigment melanin, which is considered to act as a protective agent to reduce the harmful effects of ultraviolet (UV) light. This protective effect is largely associated to the absorption of UV radiation by melanin, but other properties must

also contribute to this effect. One possibility is melanin's ability to remove reactive oxygen species (ROS) or inhibit their formation [1]. Conversely, the photobiology of melanin has controversial aspects because *in vitro* studies showed that irradiation of melanin by UV light can generate ROS, such as superoxide ( $O_2^{\bullet-}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and hydroxyl

\*Corresponding author. Fax: +55 41 3266 2042.

E-mail address: [grmartinez@ufpr.br](mailto:grmartinez@ufpr.br) (G.R. Martinez).

radical ( $\bullet\text{OH}$ ) [2]. Also, even in the absence of light irradiation, melanin promotes DNA breakage and its interaction with the DNA prevents the action of repair enzymes, by hindering the access of these enzymes to lesions [3]. These effects may be associated to a possible cellular injury under conditions of melanogenesis in excess.

The stimulation of melanin production is mediated by a variety of signaling pathways that involve a chain of enzymatic and non-enzymatic reactions. Besides the involvement of essential enzymes, such as tyrosinase, in this process, other studies indicated the involvement of different proteins in the mechanism of melanogenesis, such as HSP70, which is associated with the suppression of melanin production from UV-induced melanogenesis in B16 cells [4] and prohibitin, which functions as a regulator of melanogenesis in Melan-A and B16-F10 cells [5]. Interestingly, an examination by proteomics analysis of the effects of inhibition of melanogenesis by kojic acid in A375 human malignant melanoma cells showed alterations in cytoskeletal proteins, while other proteins were found to be involved in cell proliferation [6]. Additionally, stimulation of melanogenesis with ursolic acid in B16-F0 melanoma cells showed inhibition of cell proliferation beyond the triggering of a resistance mechanism to delay death [7]. These data suggest that highly complex signal transduction pathways mediate melanogenesis and that other factors besides the amount of melanin may be contributing to the cellular effects of melanogenesis.

The structure of melanosomes is abnormal in melanoma cells, which can facilitate leakage of melanin synthesis intermediates, including semiquinone radicals formed during melanogenesis [8]. Additionally, the generation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in the terminal polymerization process of melanin synthesis was detected during auto-oxidation and enzyme-mediated oxidations of melanin precursors [9]. Therefore, the melanogenic process may cause cellular damage resulting from the action of toxic intermediates generated during melanin synthesis. In fact, an increase in oxidatively induced lesions of DNA bases was observed in melanoma cells with stimulated synthesis of melanin and irradiation with UV light [10].

In the present study, we demonstrated that melanogenesis stimulation by L-tyrosine and ammonium chloride of the B16-F10 murine melanoma cell line, which naturally produces melanin pigment, induces a significant increase in ROS production, cell cycle arrest at the G1 phase, increased levels of p21 mRNA and alterations in the protein profile of key proteins of the cell cycle and glucose metabolism, as revealed by proteomic analysis. We believe that these induced alterations suggest that cells would be entering a quiescent state, which may provide a strategy for recovering from the deleterious effects of melanogenesis.

## Materials and methods

### Cell culture

The murine melanoma cell line, B16-F10, was maintained in RPMI 1640 and was supplemented with 7.5% (v/v) fetal bovine serum, 0.8 mM sodium bicarbonate, 20 mM HEPES (pH 7.4) and 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gentamicin. Cultures were maintained in a humidified air incubator containing 2.5% (v/v)  $\text{CO}_2$  at 37 °C.

### Stimulation of melanogenesis

Cells were incubated for 48 h in cell culture medium supplemented with 0.4 mM L-tyrosine and 10 mM ammonium chloride to stimulate melanogenesis [11]. After this period, the medium was removed and the cells were suspended in PBS containing 2 mM EDTA. An aliquot of this suspension was used to measure protein levels by the method of Bradford. The suspension was centrifuged at  $10,000 \times g$  for 5 min at 4 °C. The cell pellet was used to determine the amount of melanin. Detection of melanin was performed by the incubation of homogenized cells overnight in 1 M NaOH, followed by the measurement of the absorption of the extract at 470 nm, which was then corrected for protein concentration [10]. For 2-D gel analysis, after stimulation of melanogenesis, cells were maintained for an additional 14 h in culture medium without supplementation before being lysed. All experiments were done with tyrosine and ammonium chloride controls separately as well (data not shown).

### Determination of intracellular ROS

Culture medium containing 0.4 mM L-Tyrosine and 10 mM ammonium chloride, along with the probe, DCFH-DA (5  $\mu\text{M}$ ), was added to the cells for the duration of the incubation period in the stimulating medium. At increasing time intervals, cells were harvested and washed twice with PBS. Flow cytometry analyses were then performed using a FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, equipped with an FL1 filter), which was set to monitor 10,000 events, as previously described [12]. FACS data were analyzed using the program, WinMDI (version 2.9).

### Cell viability measurements

Cell viability was determined by a modification of the mitochondrial dehydrogenase MTT assay, as previously described [13]. Following the incubation period for inducing melanogenesis, wells were filled with 180  $\mu\text{l}$  of HBSS and 20  $\mu\text{l}$  of MTT (5 mg/ml). Following 3 h of incubation at 37 °C/5%  $\text{CO}_2$ , unreacted MTT was removed, and formazan crystals were solubilized in DMSO (200  $\mu\text{l}/\text{well}$ ). After plate mixing to ensure complete homogeneity, the optical density was read at 550 nm. Cytotoxicity was calculated as the percent reduction in absorbance (minus the background) relative to the control group. Another method used was Crystal Violet staining, as previously described [14]. Cells were then washed with pre-warmed PBS and fixed in absolute cold methanol for 10 min at minus 20°. After two washes with room temperature PBS, cells remaining on the well plate were stained for three minutes with a crystal violet solution (0.2% crystal violet, 2% ethanol). After removal of the crystal violet solution, the plates were washed five times. Plates were left to dry at 37° and 0.6 ml of crystal violet destaining solution (50% Ethanol, 0.05 M Sodium Citrate) were then added to each well. Optical density was then measured reading the absorbance at 540 nm.

### Growth curve determinations

Cells were plated ( $3 \times 10^4/\text{well}$ ) in 24-well plates. After a 4 h incubation to allow the cells to adhere to the well bottoms, the time zero point (baseline) was collected and the cells were incubated in RPMI culture medium supplemented with or

without the stimulatory agents, L-tyrosine and ammonium chloride. After 24 h and 48 h, the cells were harvested and counted. After 48 h, the culture medium was replaced with medium without L-tyrosine and ammonium chloride. Then, after an additional 24 and 48 h incubation, the cells were harvested and counted (labeled as 72 and 96 h in the graph).

### Cell cycle analysis

Cells were harvested, washed twice with PBS and stained with a 25 µg/ml propidium iodide solution. Flow cytometry analyses were then performed using a FACSCalibur (equipped with an FL2 filter), which was set to monitor 10,000 events, as previously described [12]. FACS data were analyzed using the software FCS Express 4 Flow Research.

### Determination of cellular senescence by $\beta$ -galactosidase staining

Cellular senescence was evaluated with the Senescence  $\beta$ -Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology, Danvers, MA). This method is based on the formation of a compound at pH 6.0 that produces a blue color in senescent cells due to the accumulation of the enzyme in the lysosomes [15].

### Reverse transcription and real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Total RNA was extracted from the B16-F10 cell lines using an RNeasy Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed with 1 µg of total RNA using Oligo dT primers (Fermentas Biotech, Hanover, MD) and the SuperScript III enzyme (Invitrogen, Carlsbad, CA), as described in the manufacturer's instructions. To amplify and quantify target cDNA, diluted reverse transcribed samples were subjected to RT-qPCR amplification with the Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) at 60 °C with each specific primer (Eurogentec, Angers, France) (see Table S2 of the Supporting Information).

Gene expression is presented as the geometric means, calculated with the program, geNorm 3.4, of the expression levels of two endogenous genes, GAPDH and HPRT, that are constitutively and independently expressed, respectively, as described previously [16].

### Determination of quiescence by fluorescence analyses

Cells were harvested, washed twice with PBS and stained with a 10 µg/ml Hoechst 33342 for 45 min at 37 °C. After, it was added directly to the cells 100 µg/ml Pyronin Y for 10 min [17]. The fluorescence was measured in a microplate reader (TECAN Infinity) and the RNA quantity was calculated as the percent reduction in fluorescence (minus the background) relative to the control group. The data were normalized with number of viable cells.

### Protein preparation for 2-DE

Cells were removed with a scraper and resuspended in PBS. After centrifugation, the pellet was resuspended in 500 µl of extraction buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 1 M Tris, 4% CHAPS and

1 mM PMSF), subjected to three cycles of sonication at 4 °C and centrifuged 18,500 × g for 30 min at 4 °C. The supernatant was collected and the protein content quantified using the 2D Quant Kit from GE Healthcare (Waukesha, WI), using bovine serum albumin as a standard.

### 2-DE

Proteins (500 µg) were resuspended in 350 µl of a rehydration buffer containing 7 M Urea, 4% CHAPS, 2 M Thiourea, 65 mM DTT and 0.5% IPG buffer (pH 3–10 NL). For isoelectric focusing (IEF) in the first dimension, commercial IPG strips (13 cm, pH 3–10 NL) obtained from GE Healthcare were placed overnight in rehydration buffer. Subsequently, IEF was performed for 28 kVh using an IPGphor IEF System (GE Healthcare) at 20 °C following the manufacturer's instructions. Prior to running samples in the second dimension, the IPG strips were subjected to two equilibration steps (DTT and iodoacetamide). The strips were loaded and run on 12.5% polyacrylamide slab gels using the Ruby System (GE Healthcare) equipped with a programmable power control for 1 h at 60 V (30 mA/gel) at 4 °C until the dye front reached the gel bottom. The separated proteins were visualized after staining with Coomassie colloidal dye.

### 2-D Gel scanning and analysis

After staining, gels were scanned using the Image Scanner Data Acquisition System (GE Healthcare). Spot detection, mapping, spot volume determination and comparisons between gels were performed using ImageMaster 2D Platinum software, version 6.0 (GE Healthcare). The 2-D maps obtained from B16-F10 samples contained an average of 800–900 spots.

### In-gel digestion, peptide extraction and MS analysis

The protein spots were excised from 2D gels and digested with trypsin, as previously reported [18]. The trypsinized samples were premixed at a ratio of 1:1 with the matrix solution (5 mg/mL R-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) in 50% ACN, 0.1% (v/v) TFA) and spotted onto the 96-well MALDI sample stage. The samples were analyzed by PMF/MALDI-TOF (Bruker Autoflex III, Bruker Daltonics, Inc., Bremen, Germany). The MASCOT search engine (<http://www.matrixscience.com>) was used for peptide mass fingerprinting (PMF). Mono-isotopic mass was utilized as the search parameter, incorporating oxidation at methionine residues and carbamidomethylation at cysteine residues. Only one missed trypsin cleavage was allowed, and peptide mass tolerances of 100 ppm were used for PM. The search for identified proteins was performed using the NCBI (National Center for Biotechnology Information) database.

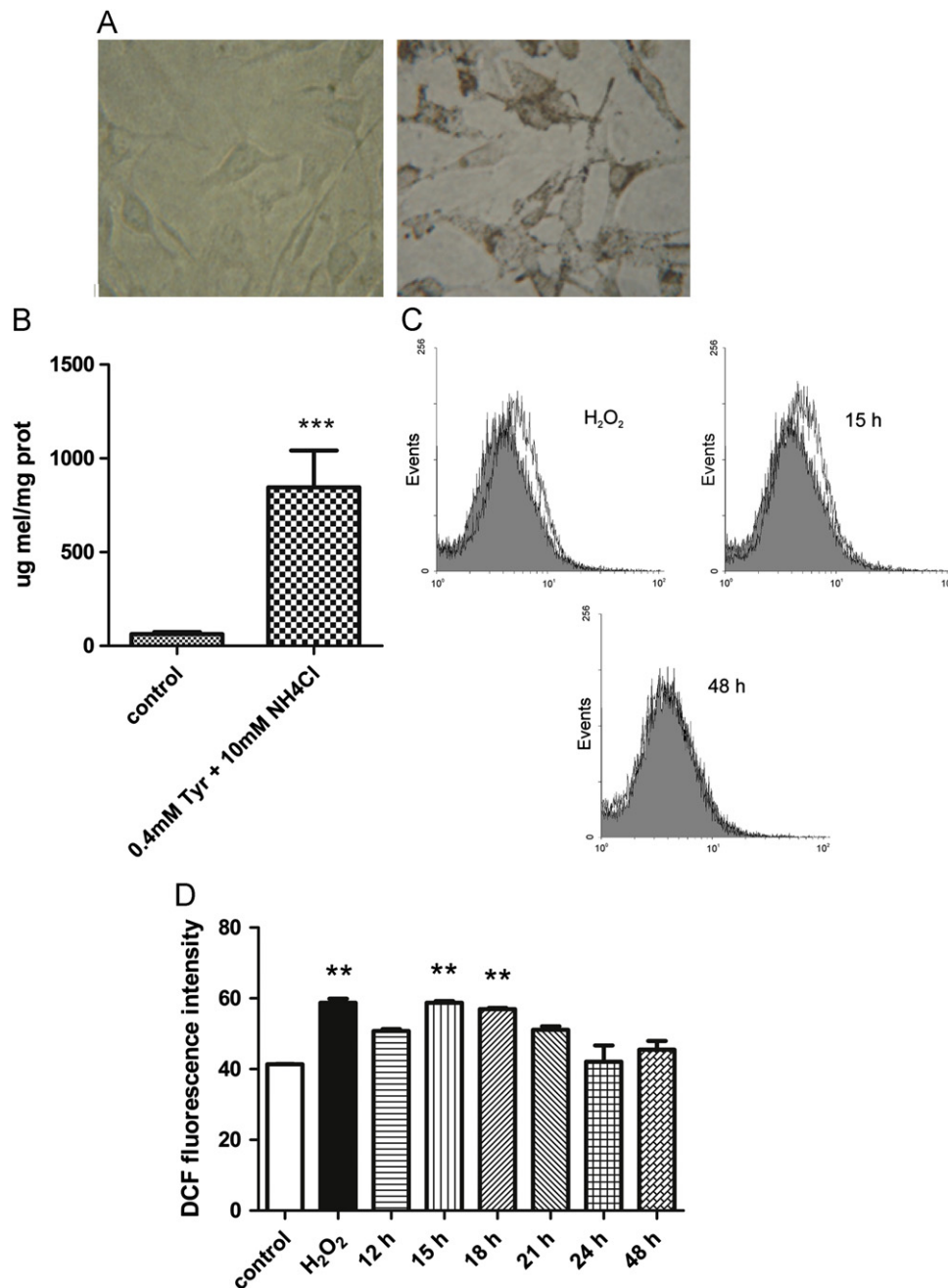
### Lactate dehydrogenase activity

After stimulation of melanogenesis, cells were washed with PBS, removed from the plate with trypsin, transferred to eppendorf tubes, centrifuged at 2000 rpm for 5 min and subjected to three cycles of sonication at 4 °C. The reaction was performed at 37 °C in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) containing 1.2 mM pyruvate and 3.0 mM NADH [19]. A total of 60 µl of the samples was placed into the wells of 96-well microplates and the reaction was initiated by the addition of 140 µl of the reaction buffer

described above. NADH consumption was measured at 340 nm and the change in absorption per minute was determined over a 10 min interval. To measure the specific activity of LDH, activity values, in U/ml, were first converted to U/L and then normalized to protein concentrations, as determined by Bradford's method.

### Statistical analyses

The comparisons between 2-D maps of B16-F10 cells were made based only on spots present in all three replicate gels under each condition. All protein spots were evaluated for statistical



**Fig. 1** – Melanin synthesis and ROS generation induced by L-tyrosine and ammonium chloride in B16-F10 melanoma cells. (A) Representative images of B16-F10 cells without induction (left) and after 48 h of stimulation (right). (B) Spectrophotometric analysis of intracellular melanin concentrations in cell lysates after 48 h of stimulation. Data are shown as the means  $\pm$  SD of three independent experiments and the results are expressed as  $\mu$ g of melanin/mg of protein (\*\* $p < 0.001$ ). (C) Flow cytometry analysis of ROS generation using DCFH-DA at increasing time points (black lines) following stimulation of the B16-F10 cell line compared to the control group (filled curve). Flow cytometry analyses were performed using a FACSCalibur (equipped with an FL1 filter), which was set to monitor 10,000 events. (D) FACS data were analyzed using the program WinMDI (version 2.9). Hydrogen peroxide was used as a positive control of ROS production (400  $\mu$ M, 30 min). Data are shown as the means  $\pm$  SD of three independent experiments (\*\* $p < 0.005$ ).



significance using the Student's *t*-test. All spots with *p*-values of <0.05 were considered to undergo a significant change in regulation.

In all experiments data are given as mean±SD and were analyzed by the Student or ANOVA tests.

## Results

### Melanin synthesis and ROS generation

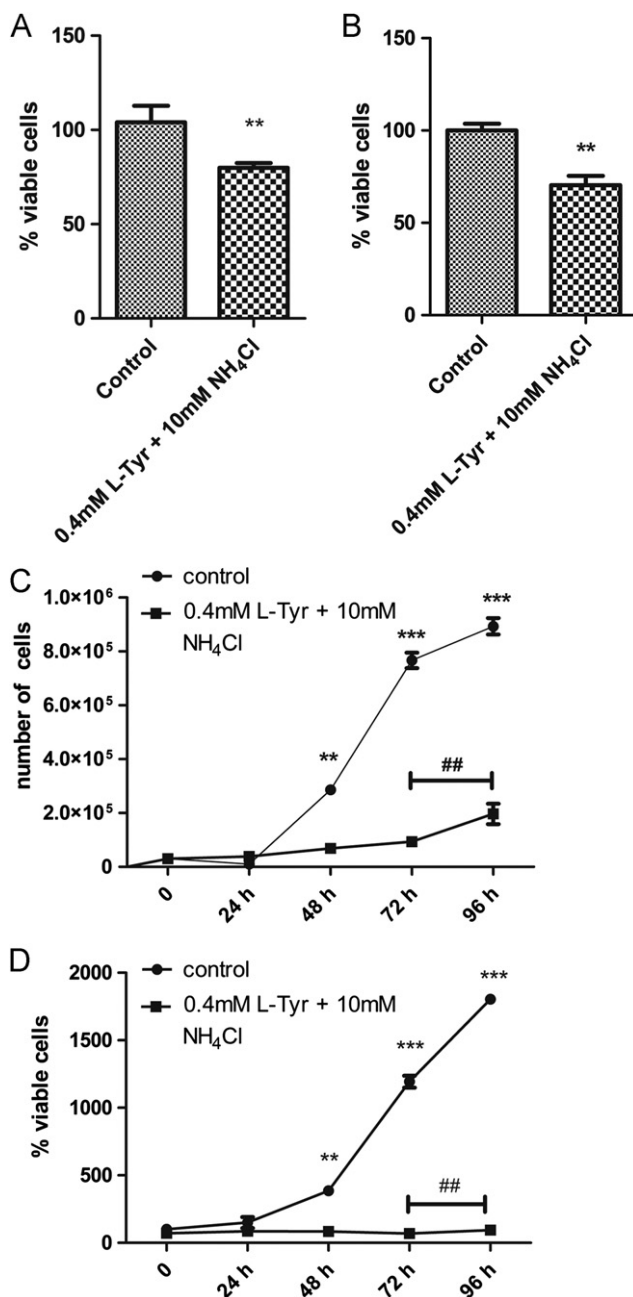
We observed few cellular morphologic changes and black pigments inside the cells after a 48 h treatment period of the B16-F10 melanoma cells with L-tyrosine and ammonium chloride (Fig. 1A). In addition, this treatment significantly induced melanin synthesis, increasing levels by 1000-fold (*p*<0.001), as

shown in Fig. 1B, which is in agreement with the findings reported previous [11].

Numerous authors have discussed the cellular effects of melanogenesis because evidence indicates that intracellular ROS are formed during this process [20,21]. In fact, Nappi and Vass [9] also proposed that the process of melanogenesis involves ROS production; however, they only demonstrated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation by auto-oxidation and enzyme-mediated polymerization of melanin. We now report that melanogenesis stimulation of B16-F10 cells promoted ROS production between 15 and 18 h after the addition of medium supplemented with L-tyrosine and ammonium chloride, with ROS levels decreasing after 21 h and remaining low after up to 48 h of incubation (Fig. 1C–D).

### Cell proliferation analysis by L-tyrosine and ammonium chloride stimulation

To evaluate whether ROS production could exert a toxic effect on B16-F10 cells, we investigated the possible promotion of cell death with Crystal Violet staining and MTT assays. For this purpose, after stimulation of B16-F10 cells over a 48 h period to produce melanin, the culture medium was replaced with a medium not containing stimulatory agents following incubation for additional 14 h. We observed that L-tyrosine/ammonium chloride treatment of B16-F10 cells promoted a decrease in cell viability by approximately 24% (Crystal Violet, Fig. 2A) and 30% (MTT, Fig. 2B). Since Pinon and colleagues [7] showed that melanin can protect melanoma cells from apoptosis, whereas other studies showed that melanogenesis may affect cell growth [22], we investigated whether the reduction of cell viability observed in the B16-F10 cells treated with L-tyrosine/ammonium chloride was caused by increased cell death or an arrest of proliferation. Therefore, B16-F10 cells were maintained in L-tyrosine/ammonium chloride medium for 48 h; this step was followed by replacement of the culture medium with a medium not containing the stimulatory agents for an additional 48 h incubation. The growth rates of the stimulated and control cells were compared. Our data showed that after 48 h of treatment,



**Fig. 2 – Melanogenesis induction by L-tyrosine and ammonium chloride inhibits cell proliferation.** (A) Cell viability was determined by Crystal Violet assay following 14 h of stimulation. (B) Cell viability was determined with a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay following 14 h of stimulation. Data are represented as the means±SD of three independent experiments and the results are expressed as the percentage of viable cells compared to the control group (\*\**p*<0.005). (C) The growth curve was determined by direct cell counting. Cells were trypsinized and counted in a Neubauer chamber under a light microscope. (D) The growth curve was determined by MTT assay. For (C) and (D), the B16-F10 cells were maintained in L-tyrosine-/ammonium chloride-supplemented medium for 48 h; this step was followed by replacement of the culture medium with a medium not containing the stimulatory agents for an additional 48 h incubation. Data are shown as the means±SD of three independent experiments (\**p*<0.005; \*\*\**p*<0.001 compared to the time-matched control group; ##*p*<0.005 compared to the 72 h L-tyrosine-/ammonium chloride-treated group).

the stimulated cells stopped growing and the inhibition continued for more than 24 h after removal of the stimulus when evaluated by cell counting or MTT assay (Fig. 2C and D).

### Analysis of cell cycle after melanogenesis stimulation

Previous studies in human melanocytes showed that melanogenesis may delay cell cycle progression by arresting growth [22]. To investigate possible alterations in the cell cycle that could result in growth arrest caused by the induction of melanogenesis in our model, the cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry.

Melanogenesis stimulation of B16-F10 cells with L-tyrosine and ammonium chloride was able to induce cell cycle arrest in the G1 phase. Data showed differences in the amount of cells in each phase of the cell cycle (Fig. 3). In the B16-F10 control cells, the cell population in the G1-phase was approximately 60%, whereas B16-F10 stimulated-cells showed a significant increase in this cell population, reaching almost 70%. The results of cell distribution in the G2-M-phase showed a decrease, from approximately 15% in the control group, to approximately 3% in the stimulated cells (Fig. 3B). Similar results were observed when analysis was performed 14 h after replacing the culture medium with a medium not containing stimulatory agents (data not shown).

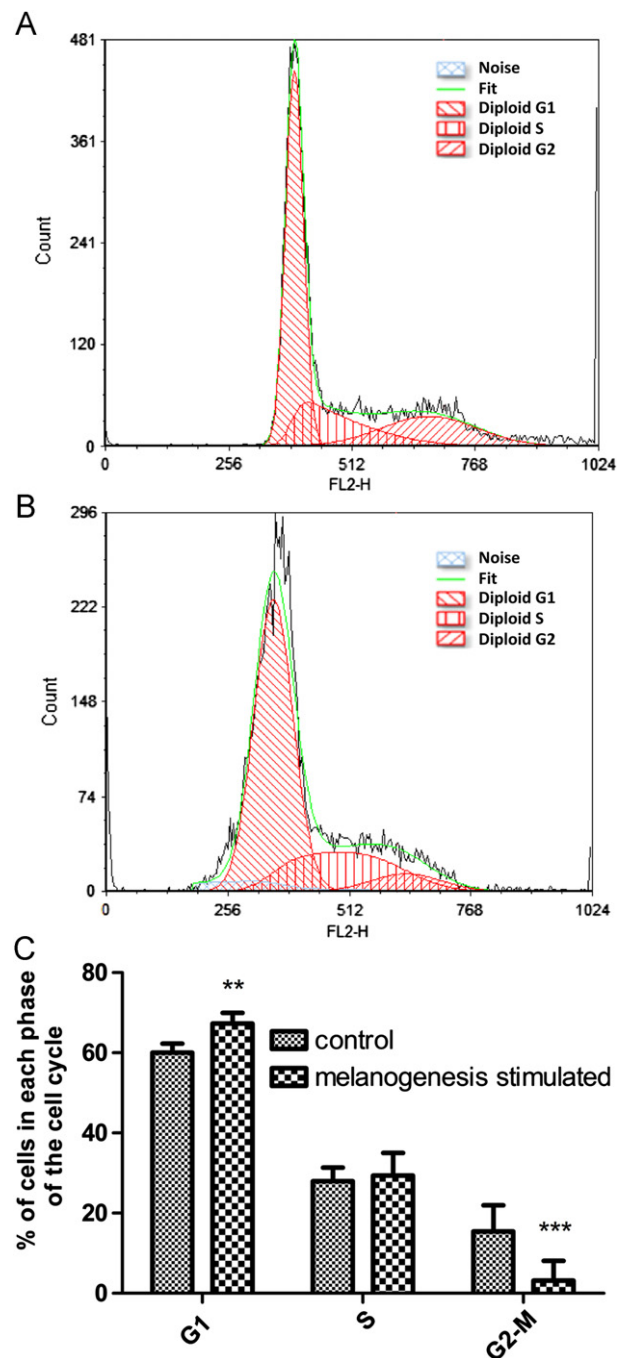
### Expression analysis of tumor suppressors genes

It has been shown that cell cycle arrest in the G1 phase is one of the characteristics of senescent cells [23], whereas other studies showed a positive correlation between melanogenesis and senescence [22]. Therefore, we investigated the possible promotion of cellular senescence in B16-F10 cells after melanogenesis stimulation with L-tyrosine/ammonium chloride using a  $\beta$ -galactosidase assay. However, very few labeled cells were observed for  $\beta$ -galactosidase activity in both conditions (Fig. 4A), indicating that senescence was not the mechanism responsible for arresting the cell cycle.

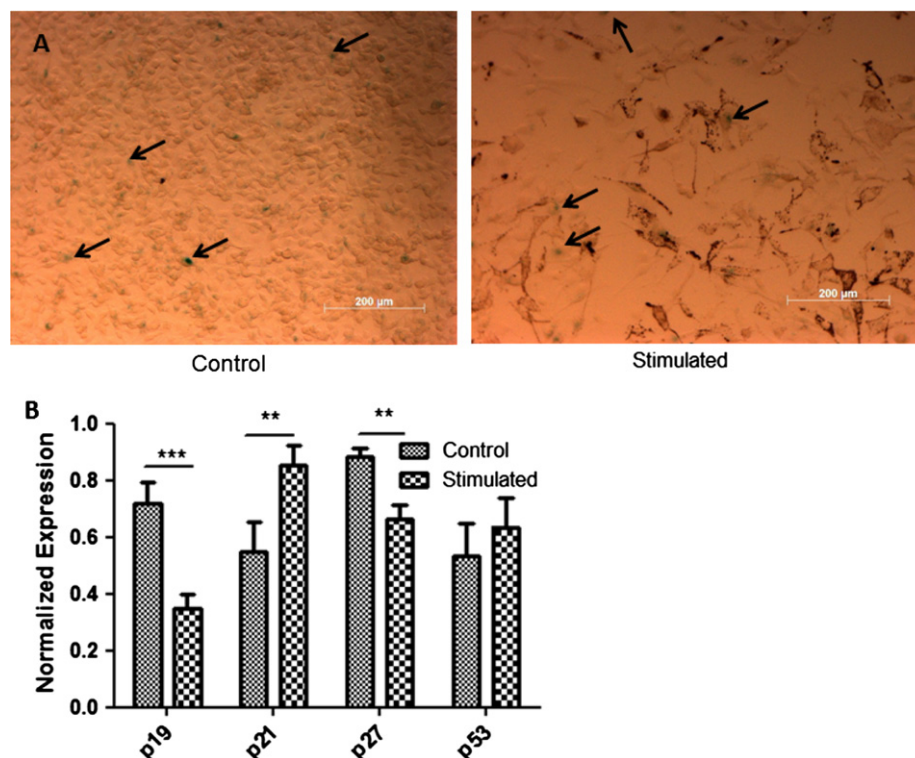
To better characterize cell cycle arrest, the mRNAs of several cell cycle proteins, which are encoded by genes p19, p21, p27 and p53 [24], were investigated. Quantification of the mRNA expression levels of p19, p21, p27 and p53 were performed using reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) assays. The results showed that melanogenesis stimulation of B16-F10 cells promoted a significant decrease in p19 (2-fold) and p27 (1.3-fold) mRNA expression levels, an increase in p21 (1.5-fold) mRNA levels and no alteration in p53 mRNA levels (Fig. 4B). Despite the increase in p21 levels, which is indicative of cellular senescence, the data regarding the other genes (p19, p27 and p53) do not support an involvement of senescence. These results suggest a possible induction of quiescence because the p21 protein is involved in the reversible transition from proliferation to a non-dividing, quiescent state (also known as the G0 phase) [25].

### Quiescence analyses

In order to evaluate the presence of quiescence cells, we performed a fluorescence experiment to separate G0 and G1 cells. Hoechst is an exclusive DNA dye while Pyronin Y reacts



**Fig. 3 – Inhibition of cell proliferation is due to cell cycle arrest in the G1 phase.** (A) Flow cytometry analysis of the cell cycle distribution in control of the B16-F10 cell line. (B) Flow cytometry analysis of the cell cycle distribution after induction of melanogenesis in the B16-F10 cell line. For (A) and (B), after 48 h of induction, cells were harvested, washed twice with PBS, stained with 25  $\mu$ g/ml propidium iodide solution and analyzed with a FACSCalibur (equipped with an FL2 filter), which was set to monitor 10,000 events. (C) FACS data were analyzed using the Software FCS Express 4 Flow Research Edition. Data are shown as the means  $\pm$  SD of three independent experiments (\*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).



**Fig. 4 – Involvement of p21 in the arrest of the cell cycle.** (A) Representative micrographs of B16-F10 control cells (left) and stimulated cells (right). Cells were plated, stimulated, stained using the Senescence  $\beta$ -Galactosidase Staining Kit and analyzed using a light microscope (100x magnification). Arrows indicate blue staining in the senescent cells. (B) RT-qPCR data for genes p19, p21, p27 and p53. The results are presented as the relative expression of each transcript normalized to GAPDH and HPRT genes. Data are shown as the means  $\pm$  SD of three independent experiments (\*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

with both DNA and RNA. In the presence of Hoechst, Pyronin Y interaction with DNA is blocked, and Pyronin Y stains RNA only. When cells are stained first with Hoechst33342 and then with Pyronin Y, it is possible to distinguish DNA from RNA. Furthermore, quiescent cells, which are arrested in G0 phase, have lower level of RNA compared to active cells (G1 phase) [17]. Our results showed a significant decrease in RNA of cells with melanogenesis stimulated (Fig. 5) indicating that this condition is able to induce the entry of cells into a quiescent state.

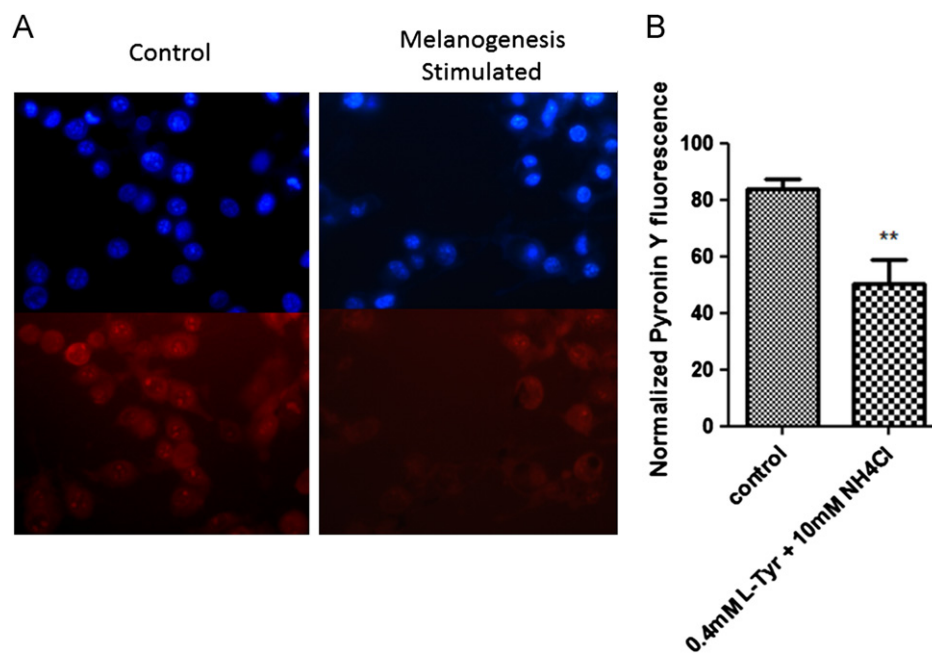
#### Proteomic analysis after melanogenesis stimulation

To provide further evidence of melanogenesis at the molecular level, we performed a comprehensive proteomic study to identify what alterations in protein expression occurred. B16-F10 cells were stimulated with L-tyrosine/ammonium chloride for 48 h; this step was followed by replacement of the culture medium with a medium not containing the stimulatory agents for additional 14 h incubation, in order to understand the cellular response under a condition where cells have already more melanin and must deal with it. The whole-cell homogenate was then analyzed using two-dimensional electrophoresis (2-DE).

Following Coomassie blue staining, the gels were subjected to analysis using Image Master Platinum (version 6.0) software. Fig. 6A shows image of a representative 2-DE gel of proteins from B16-F10 control cells. Approximately 638 spots were found in

this control sample, whereas 421 spots were found after melanogenesis stimulation (see Fig. S1 of the Supporting Information). A comparison between these gels showed that 328 spots were present under both conditions, with 33 matches being up-regulated and 28 matches being down-regulated, after melanogenesis stimulation. Additionally, 310 spots were present only in the control cells, while 93 spots were present after stimulation. Forty-nine of these proteins were successfully identified by MS; among these, 16 protein spots were expressed to a greater extent and 31 protein spots were expressed to a lesser extent in B16-F10 cells after stimulation.

The MS-identified proteins in the triplicates with significant changes in the media values of spot volume percentages ( $p < 0.05$ ) are summarized in Table 1. Prohibitin (+1.68x), the receptor for activated protein kinase C (RACK-1) (−1.64x), heat-shock protein 90 (HSP90) (differential—Fig. 6B) and cyclin-dependent kinase 3 (CDK3) (differential—Fig. 6B), have been previously shown to be related to the cell cycle [26–29]. Protein disulfide isomerase A3 (PDIA3) (+3.25x), heat-shock 70 (HSP70) (+1.71x) and ornithine aminotransferase (OAT) (+1.91x) have previously been shown to be related to cellular defense mechanisms [30–32]. Fructose biphosphate aldolase A (+2.09x), phospholipase C- $\alpha$  (+1.70x), isocitrate dehydrogenase 3  $\alpha$  (+1.94x) and lactate dehydrogenase (LDH) (−3.20x) have been previously been shown to be related to metabolic and cancer alterations [33–35].



**Fig. 5 – Fluorescence analysis confirming quiescence.** (A) Separate packaging of RNA and DNA after melanogenesis stimulus by differential staining of DNA with Hoechst 33342 vs. RNA with pyronin Y. The cells were then fixed and stained with Hoechst 33342 and pyronin Y, and the same field of view was observed sequentially under fluorescence microscope using either UV (up) or green light (down). (B). Fluorescence analysis of quiescent cells after 48 h of induction of melanogenesis in the B16-F10 cell line. After 48 h of induction, cells were harvested, washed twice with PBS, stained with 10  $\mu$ g/ml Hoechst 33342 for 45 min at 37  $^{\circ}$ C. After that, 100  $\mu$ g/ml Pyronin Y was added directly to the cells and incubated for 10 min. The fluorescence was measured in a microplate lector (TECAN Infinity) and the RNA quantity was calculated as the percent reduction in fluorescence (minus the background) relative to the control group. The data were normalized by the number of viable cells. Data are shown as the means  $\pm$  SD of three independent experiments (\*\* $p < 0.005$ ).

#### RT-qPCR analysis after melanogenesis stimulation

Proteomic results showed that melanogenesis stimulation evoked modifications in cell metabolism. On this basis, we investigated whether other important proteins, in spite of not showing significant differences between the gels (Table S1), could exhibit differences in their mRNA levels, as determined using RT-qPCR analysis.

OAT, HSP90, vimentin, pyruvate kinase isoform M2 (PKM2) and ATP synthase subunit  $\beta$ -F1 (ATP synthase) were chosen according to the importance of the proteins in relation to tumor metabolism and melanogenesis. Vimentin, PKM2 and ATP synthase had their mRNA expression levels in agreement with the proteomic data, whereas OAT and HSP90 did not show a correlation between mRNA and protein levels (Fig. 7A).

Because the possibility exists that the aerobic metabolism of these cells could be altered under conditions of melanogenesis stimulation and the proteomic data indicated a decrease in LDH abundance, we investigated the activity of LDH (Fig. 7B). These data showed a decline in anaerobic metabolism due to a decrease in LDH activity.

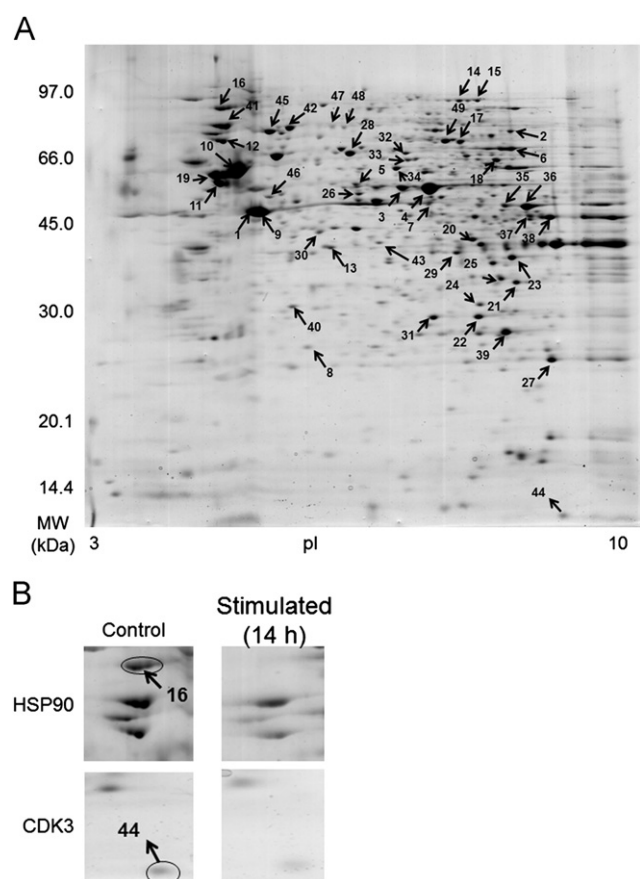
#### Discussion

Artificial melanin synthesis leads to the generation of  $H_2O_2$  in polymerization reactions involving quinone intermediates [9]. This behavior is also expected to occur inside cells as many

authors have proposed [20,21]. In this study, our results clearly show increased levels of ROS after 15 h of melanogenesis stimulation, confirming the importance of ROS in this process, which could contribute to the cellular response. In fact, the melanogenesis itself could be accelerated by ROS because it was shown that tyrosinase is up-regulated and activated by low concentrations ( $\mu$ M levels) of  $H_2O_2$  [36]. Moreover,  $H_2O_2$  formed during melanogenesis can activate transcription factors, and consequently, the expression of genes and proteins, and can also lead to the deactivation of important cell signaling pathways [37,38].

In the present study, we demonstrated that melanogenesis stimulation of B16-F10 cells also inhibits proliferation and induces cell cycle arrest in the G1 phase, in addition to increasing mRNA levels of p21 and decreasing mRNA levels of p19 and p27. Because previous reports have demonstrated involvement of p21 in senescence under different conditions [39,40], we investigated the cellular senescence process by assessing  $\beta$ -galactosidase activity in B16-F10 cells treated with L-tyrosine/ammonium chloride. However, our results do not show the involvement of senescence. Another possibility related to the alterations we had observed is an increase in a quiescent state, as some cells try to recover from death by becoming quiescent (a state of non-proliferation that makes cells more resistant to toxic compounds). Some authors describe that in order for cells to enter into a state of quiescence, cells need glucose deprivation and other alterations in cell cycle signaling, but a unified view of the molecular determinants of the quiescent state in eukaryotes is





**Fig. 6 – Proteomic analysis showing alterations in the protein profile of proteins in the cell cycle and glucose metabolism after melanogenesis stimulus. (A) Representative 2-DE map of control B16-F10 cells. A total of 500 µg of a total protein extract of B16-F10 cells was subjected to IEF using 3–10 pI strips, followed by SDS-PAGE in 12.5% polyacrylamide gels. Numbered spots indicate proteins identified by MALDI-TOF MS and are listed in Tables 1 and S1 of the Supporting Information (B) Spots differentially detected in a 2-DE map of B16-F10 control cells that are not present in extracts from stimulated cells. Mass markers were assigned based on standard proteins and are therefore not present in the figure.**

clearly lacking [41]. Although p21 and p27 levels usually increase together during quiescence [42], some studies showed compensation of p21 expression in the absence of p27 [42,43].

We examined the protein profile of B16-F10 cells after stimulation with L-tyrosine/ammonium chloride by proteomic analysis and observed that melanogenesis stimulation significantly altered the following proteins: prohibitin (+1.68), RACK-1 (−1.64x), HSP90 (differential), CDK3 (differential), PDIA3 (+3.25x), HSP70 (+1.71x), OAT (+1.91x), fructose biphosphate aldolase A (+2.09x), phospholipase C-α (+1.70x), Isocitrate dehydrogenase 3 α (+1.94x) and LDH (−3.20x). These data demonstrated that B16-F10 cells show a complex response that involves metabolism, signaling and cell defense alterations.

After induction of melanogenesis, the presence of HSP90 and CDK3 was only observed in the control cells, whereas prohibitin was up-regulated and RACK-1 was down-regulated. All these alterations are in accordance with cell cycle arrest. HSP90

participates as part of a multichaperone complex and needs ATP for its function. Some client proteins of HSP90 participate in Ras signaling, which is involved in both proliferation and the prevention of apoptosis [29]. In this study, although HSP90 was not detected in 2-DE after melanogenesis stimulation of B16-F10 cells, increased levels of HSP90 mRNA expression was detected by RT-qPCR (Fig. 7A). This finding is probably related to the fact that when HSP90 levels are depleted, HSF1 (heat-shock transcription factor) is released, which is then able to enter the nucleus and begin transcribing genes containing heat shock elements (HSE), thereby reinforcing HSP synthesis [44]. CDK3 was not detected after melanogenesis induction in B16-F10 cells, which is in accordance to the cell cycle alteration (increased G1 phase). This protein is classified as a cyclin-dependent kinase because it has a sequence almost identical to that of CDK2 [45], but participates in the G1-S progression differently by binding to the transcription factor E2F [46]. In studies involving transfection of a dominant negative of CDK3, there was an accumulation of cells in G1 [47]. Another CDK3 substrate, c-jun, is a component of the transcription factor AP-1 involved in the development and proliferation of tumor cells. Other studies showed that CDK3 phosphorylates c-jun at Ser 63/73 and increases AP-1 activity, resulting in enhanced anchorage-independent cell proliferation [28]. Prohibitin is a potential tumor suppressor that is involved in changes of the cell cycle by repressing E2F action [26], while RACK-1 can alter tumor growth because its down-regulation in tumor cells suppresses cell proliferation [27].

Up-regulation of PDIA3, HSP70 and OAT indicates an attempt at cell recovery. PDIA3, a member of the glucose-regulated protein (GRP) family, catalyzes the *in vitro* isomerization of intramolecular disulfide bridges, thereby promoting protein folding within the endoplasmic reticulum [30]. HSP70 also provides resistance to refolding or degradation of denatured proteins produced by stressors such as reactive species [31]. In the present study, these proteins increased in response to stress generated by the process of melanogenesis, which probably reflects an attempt at cell survival through the recovery of proteins potentially affected by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The protein OAT is a pyridoxal phosphate-dependent mitochondrial enzyme involved in the metabolism of ornithine [32]. Although in our study, this protein is up-regulated after melanogenesis, PCR analysis indicated that the levels of OAT mRNA expression decreased. This enzyme can also prevent ammonia accumulation [48]. Thus, the modulation of its levels is probably associated with the presence of the ammonium chloride used in the stimulation of melanogenesis because after withdrawal of the stimulus, its levels dropped.

Up-regulation of fructose biphosphate aldolase A and down-regulation of LDH along with analysis of the levels of PKM2 mRNA and LDH activity suggest an alteration in glucose metabolism. PKM2 is an enzyme of a regulated step in the glycolytic pathway and is consistently altered during tumorigenesis [49]. According to 2-DE, PKM2 levels tend to decrease after stimulation, with PCR results confirming this trend. Another glycolytic enzyme identified and differentially regulated (up-regulated) after melanogenesis stimulation was fructose biphosphate aldolase A (isoform 2). Because the shutdown of the glycolytic pathway is an irreversible step catalyzed by PKM2, the products of the aldolase reaction tend to accumulate. The product glyceraldehyde 3-phosphate is used in the pentose phosphate pathway,

**Table 1 – MALDI-TOF identification of proteins with statistical difference.**

No <sup>a</sup>	Protein <sup>b</sup>	Sequence covered, % <sup>c</sup>	No. of matched peptide	Access number NCBI <sup>d</sup>	Mass/pl <sup>e</sup>	MASCOT Score <sup>f</sup>	Fold changes after stimulus <sup>g</sup>
16	Heat shock protein 90 (HSP90)	28	19	NP32328	83.571/4.97	152	<sup>h</sup>
21	Activated protein kinase C receptor (RACK-1)	47	11	AAG29506	33.502/7.61	143	–1.64
23	Lactate dehydrogenase (LDH)	33	11	AAH05509	34.823/8.18	137	–3.20
26	Ornithine aminotransferase, mitochondrial precursor (OAT)	18	7	NP58674	48.723/6.19	103	+1.91
28	Phospholipase C- $\alpha$	29	12	AAA39944	39.944/5.98	106	+1.70
30	Isocitrate dehydrogenase 3 $\alpha$	25	6	EDL25822	35.021/5.86	103	+1.94
37	Fructose-biphosphate aldolase A isoform 2	31	7	NP31464	39.787/8.31	91	+2.09
40	Prohibitin	21	5	NP32857	29.859/5.57	93	+1.68
42	Heat shock protein 70 (HSP70)	17	8			92	+1.71
44	Cyclin-dependent kinase 3 (CDK3)	29	4	EDL34565	14.646/8.78	76	<sup>h</sup>
48	Protein disulfide-isomerase A3 (PDIA3)	14	5			81	+3.25

<sup>a</sup> Spot numbers are indicated in Fig. 5A.<sup>b</sup> Name of proteins according to the NCBI databank.<sup>c</sup> Sequence coverage of the MS identifications.<sup>d</sup> NCBI access numbers.<sup>e</sup> Theoretical molecular masses/pl.<sup>f</sup> MASCOT score; the score in this databank for the species used in this study (*Mus musculus*) is considered acceptable ( $p < 0.05$ ) when the value is greater than 64.<sup>g</sup> “+” and “–” indicate an increase or decrease in media spot volumes of stimulated cells relative to control cells.<sup>h</sup> Proteins not visualized in treated gels.

in which NADPH is produced. NADPH is necessary for antioxidant reactions [50]. Since melanogenesis stimulation generates cellular stress, this modulation of the glycolytic pathway is essential for cell survival. Another alteration involves LDH levels. Fantin and colleagues [34] showed that LDH plays an important role in the maintenance of tumor cells and when it was inhibited, mitochondrial respiration was stimulated, which decreased mitochondrial membrane potential, thereby resulting in a decrease in the tumorigenesis of these cells.

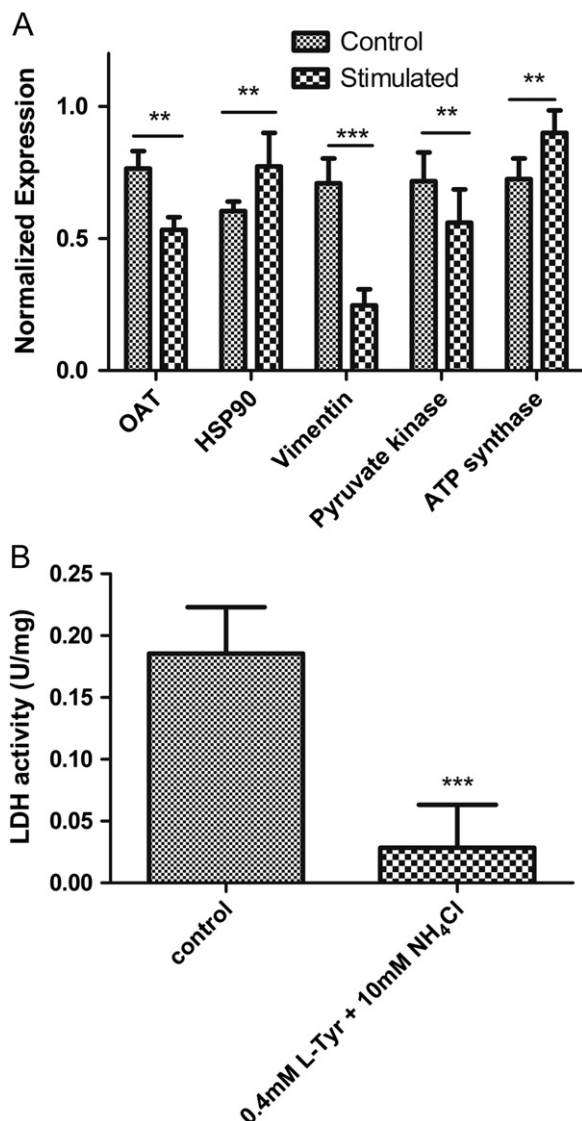
Cedrola and colleagues [51] showed that the depletion of glucose in murine melanoma cells induces a decrease in proliferation, with an increased number of cells in the G0/G1 phase, leading to a quiescent cell population. These authors also showed, using flow cytometry, an increased number of cells in the G1 phase and a decreased number of cells in the G2-M phase with glucose deprivation. Thus, the lower energetic status of the cells seems to contribute to cell cycle arrest. The alterations of glucose metabolism that we observed after inducing melanin production in our model may be contributing to the decrease in cell proliferation, along with an increased percentage of cells in the G0/G1 phase of the cell cycle. Taking our data together with the information known about ROS production, decrease in RNA levels, we propose that entry into the quiescent state could provide a resistance mechanism against oxidative stress.

RT-qPCR experiments showed alterations in mRNA expression levels of vimentin and ATP synthase. Vimentin showed a slight down-regulation in gels and its mRNA levels also decreased after melanogenesis stimulation of B16-F10 cells. This protein regulates cell migration, stress response proteins and other functions

[52]. Therefore, changes in vimentin expression levels can be generated by sources of stress, such as oxidative stress [53]. It was shown that down-regulation of vimentin inhibits migration and invasion of colon and breast cancer cell lines [54,55]. According to the 2-DE and PCR results, down-regulated vimentin can suppress cell proliferation.

ATP synthase was another protein found to be slightly increased in 2D gels. Its mRNA levels were also higher after stimulation of melanogenesis in B16-F10 cells. Indeed, the opposite effect was observed with inhibition of melanogenesis by kojic acid in a human malignant melanoma, A375 [6]. Alterations of ATP synthase are involved in the mechanisms that control mitochondrial differentiation in cancer cells and different types of tumors affect the expression of this protein differently [56]. Thus, this increase in ATP synthase reflects an attempt at cellular metabolism recovery.

The melanogenesis that occurs in melanomas has been proposed to be a factor that diminishes response to chemotherapy [57]. To our knowledge, we are the first to propose that melanogenesis stimulation of melanoma cells may be able to trigger a mechanism for cell recovery by inducing an entrance into a quiescent state. In melanocytes, the process of melanogenesis occurs inside melanosomes, which prevents the toxic compounds from reaching other cellular compartments, whereas in melanomas, the melanosomes are abnormal, resulting in an intracellular release of these toxic elements, which can be deleterious for cells [8]. In this report, we showed that induction of melanogenesis generates ROS, induces G1 arrest, and promotes important alterations in metabolism, which may serve as a



**Fig. 7 – RT-qPCR analysis confirming alterations of metabolic targets after melanogenesis stimulus. (A) RT-qPCR data for genes OAT, HSP90, Vimentin, pyruvate kinase and ATP synthase. The results are presented as the relative expression of each transcript normalized to GAPDH and HPRT genes. Data are shown as the means  $\pm$  SD of three independent experiments (\*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ). (B) Specific activity (U/mg) of LDH was measured via NADH consumption. Cells were collected after 48 h of melanogenesis induction and incubated at 37 °C with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) containing 1.2 mM pyruvate and 3.0 mM NADH. Data are shown as the means  $\pm$  SD of three independent experiments and results are normalized by protein levels (\*\*\* $p < 0.001$ ).**

biological mechanism that is able to confer resistance to cells against the side-effects of melanogenesis, such as oxidative stress.

## Conclusion

The capacity of melanoma cells to generate oxidative stress and other aspects related to the melanogenesis pathway are only

partially known. We have identified a possible biological mechanism that may protect cells against the deleterious side-effects induced by melanogenesis. The induced cellular effects, including arrest of the cell cycle, increase in p21 mRNA expression and alteration of key proteins of the cell cycle and the glucose metabolic pathway (as revealed by our proteomic analysis) with low levels of RNA in stimulated cells may provide a protective role in defending melanomas against cell death caused by oxidative stress promoted by melanogenesis.

## Acknowledgments

This work was supported by the INCT de processos Redox em Biomedicina—Redoxoma, CAPES, CT-INFRA/FINEP, CNPq and Fundação Araucaria. The authors thank INCT-Fixação de Nitrogênio for allowing the use of MALDI-TOF mass spectrometer and Dr. Roger Chammas for providing the B16-F10 cell line. The authors are also indebted to Msc. Thiago Jacomasso for the help in the construction of the primers and Msc. Andréia Akemi Suzukawa for her assistance with the cell cycle experiments.

## Appendix A. Supplementary Information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.05.019>.

## REFERENCES

- [1] V. Maresca, E. Flori, S. Briganti, A. Mastrofrancesco, C. Fabbri, A.M. Mileo, M.G. Paggi, M. Picardo, Correlation between melanogenic and catalase activity in in vitro human melanocytes: a synergic strategy against oxidative stress, *Pigment Cell Melanoma Res.* 21 (2008) 200–205.
- [2] W. Korytowski, B. Pilas, T. Sarna, B. Kalyanaraman, Photoinduced generation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in melanin, *Photochem. Photobiol.* 45 (1987) 185–190.
- [3] A.A. Suzukawa, A. Vieira, S.M.B. Winnischofer, A.C. Scalfo, P. Di Mascio, A.M.d.C. Ferreira, J.-L. Ravanat, D.d.L. Martins, M.E.M. Rocha, G.R. Martinez, Novel properties of melanins include promotion of DNA strand breaks, impairment of repair, and reduced ability to damage DNA after quenching of singlet oxygen, *Free Radic. Biol. Med.* 52 (2012) 1945–1953.
- [4] T. Hoshino, M. Matsuda, Y. Yamashita, M. Takehara, M. Fukuya, K. Minoda, D. Maji, H. Ihn, H. Adachi, G. Sobue, Y. Funasaka, T. Mizushima, Suppression of melanin production by expression of HSP70, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 13254–13263.
- [5] J.R. Snyder, A. Hall, L. Ni-Komatsu, S.M. Khersonsky, Y.-T. Chang, S.J. Orlow, Dissection of Melanogenesis with Small Molecules Identifies Prohibitin as a Regulator, *Chem. Biol.* 12 (2005) 477–484.
- [6] J. Nawarak, R. Huang-Liu, S.-H. Kao, H.-H. Liao, S. Sinchaikul, S.-T. Chen, S.-L. Cheng, Proteomics analysis of kojic acid treated A375 human malignant melanoma cells, *J. Proteome Res.* 7 (2008) 3737–3746.
- [7] A. Pinon, Y. Limami, L. Micallef, J. Cook-Moreau, B. Liagre, C. Delage, R.E. Duval, A. Simon, A novel form of melanoma apoptosis resistance: melanogenesis up-regulation in apoptotic B16-F0 cells delays ursolic acid-triggered cell death, *Exp. Cell Res.* 317 (2011) 1669–1676.
- [8] J. Borovanský, P. Mirejovský, P.A. Riley, Possible relationship between abnormal melanosomestructure and cytotoxic

- phenomena in malignant melanoma, *Neoplasma* 38 (1991) 393–400.
- [9] A.J. Nappi, E. Vass, Hydrogen peroxide generation associated with the oxidation of the melanogenic precursor 5,6-dihydroxyindole and 5,6 dihydroxyindole-2-carboxylic acid, *Melanoma Res.* 6 (1996) 341–349.
  - [10] E. Kvam, R.M. Tyrrell, The role of melanin in the induction of oxidative DNA base damage by ultraviolet A irradiation of DNA or melanoma cells 113 (1999) 209–213.
  - [11] M.J. Hoogduijn, E. Cemeli, K. Ross, D. Anderson, A.J. Thody, J.M. Wood, Melanin protects melanocytes and keratinocytes against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA strand breaks through its ability to bind Ca<sup>2+</sup>, *Exp. Cell Res.* 294 (2004) 60–67.
  - [12] J. Wang, N. Bao, L.L. Paris, R.L. Geahlen, C. Lu, Total internal reflection fluorescence flow cytometry, *Anal. Chem.* 80 (2008) 9840–9844.
  - [13] T.P. Reilly, F.H. Bellevue, P.M. Woster, C.K. Svensson, Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone, *Biochem. Pharmacol.* 55 (1998) 803–810.
  - [14] R.J. Gillies, N. Didier, M. Denton, Determination of cell number in monolayer cultures, *Anal. Biochem.* 159 (1986) 109–113.
  - [15] F. Debacq-Chainiaux, J.D. Erusalimsky, J. Campisi, O. Toussaint, Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- $\beta$ gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo, *Nat. Protocols* 4 (2009) 1798–1806.
  - [16] J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, F. Speleman, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol.* 3 (2002) research0034.0031–research0034.0011.
  - [17] H.M. Shapiro, Flow cytometric estimation of DNA and RNA content in intact cells stained with hoechst 33342 and pyronin Y, *Cytometry* 2 (1981) 143–150.
  - [18] K.R. Williams, K.L. Stone, Enzymatic cleavage and HPLC peptide mapping of proteins, *Mol. Biotechnol.* 8 (1997) 155–167.
  - [19] R. Keiding, M. Hörder, W.G. Denmark, E. Pitkänen, R. Tenhunen, J.H. Strömme, L. Theodorsen, J. Waldenström, N. Tryding, L. Westlund, Recommended Methods for the Determination of Four Enzymes in Blood, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 33 (1974) 291–306.
  - [20] S. Pavel, F. van Nieuwpoort, H. van der Meulen, C. Out, K. Pizinger, P. Cetkovská, N.P.M. Smit, H.K. Koerten, Disturbed melanin synthesis and chronic oxidative stress in dysplastic naevi, *Eur. J. Cancer* 40 (2004) 1423–1430.
  - [21] T.P. Szatrowski, C.F. Nathan, Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells, *Cancer Res.* 51 (1991) 794–798.
  - [22] M.M. Haddad, W. Xu, D.J. Schwahn, F. Liao, E.E. Medrano, Activation of a cAMP Pathway and Induction of Melanogenesis Correlate with Association of p16INK4 and p27KIP1 to CDKs, Loss of E2F-Binding Activity, and Premature Senescence of Human Melanocytes, *Exp. Cell Res.* 253 (1999) 561–572.
  - [23] G.H. Stein, L.F. Drullinger, A. Soulard, V. Dulić, Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts, *Mol. Cell Biol.* 19 (1999) 2109–2117.
  - [24] M. Collado, M. Serrano, The power and the promise of oncogene-induced senescence markers, *Nat. Rev. Cancer* 6 (2006) 472–476.
  - [25] P. Perucca, O. Cazzalini, M. Madine, M. Savio, R.A. Laskey, V. Vannini, E. Prosperi, L.A. Stivala, Loss of p21<sup>CDKN1A</sup> impairs entry to quiescence and activates a DNA damage response in normal fibroblasts induced to quiescence, *Cell Cycle* 8 (2009) 105–114.
  - [26] S. Rastogi, B. Joshi, P. Dasgupta, M. Morris, K. Wright, S. Chellappan, Prohibitin facilitates cellular senescence by recruiting specific corepressors to inhibit E2F target genes, *Mol. Cell Biol.* 26 (2006) 4161–4171.
  - [27] F. Wang, T. Osawa, R. Tsuchida, Y. Yuasa, M. Shibuya, Down-regulation of receptor for activated C-kinase 1 (RACK1) suppresses tumor growth by inhibiting tumor cell proliferation and tumor-associated angiogenesis, *Cancer Sci.* 102 (2011) 2007–2013.
  - [28] Y.-Y. Cho, F. Tang, K. Yao, C. Lu, F. Zhu, D. Zheng, A. Pugliese, A.M. Bode, Z. Dong, Cyclin-dependent kinase-3-mediated c-jun phosphorylation at Ser63 and Ser73 enhances cell transformation, *Cancer Res.* 69 (2009) 272–281.
  - [29] M. Caraglia, A. Abbuzzese, A. Leardi, S. Pepe, A. Budillon, G. Baldassare, C. Selleri, S.D. Lorenzo, A. Fabbrocini, G. Giuberti, G. Vitale, G. Lupoli, A.R. Bianco, P. Tagliaferri, Interferon-alpha induces apoptosis in human KB cells through a stress-dependent mitogen activated protein kinase pathway that is antagonized by epidermal growth factor, *Cell Death Differ.* 6 (1999) 773–780.
  - [30] R. Noiva, W.J. Lennarz, Protein disulfide isomerase. A multi-functional protein resident in the lumen of the endoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 3553–3556.
  - [31] R.I. Morimoto, M.G. Santoro, Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection, *Nat. Biotech.* 16 (1998) 833–838.
  - [32] T. Lei, Q.-Y. He, Z. Cai, Y. Zhou, Y.-L. Wang, L.-S. Si, Z. Cai, J.-F. Chiu, Proteomic analysis of chromium cytotoxicity in cultured rat lung epithelial cells, *Proteomics* 8 (2008) 2420–2429.
  - [33] J.R. Prensner, A.M. Chinnaiyan, Metabolism unhinged: IDH mutations in cancer, *Nat. Med.* 17 (2011) 291–293.
  - [34] V.R. Fantin, J. St-Pierre, P. Leder, Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance, *Cancer Cell* 9 (2006) 425–434.
  - [35] A. Suzuki, A. Iizuka, M. Komiyama, M. Takikawa, A. KUME, S. Tai, C. Ohshita, A. Kurusu, Y. Nakamura, A. Yamamoto, N. Yamazaki, S. Yoshikawa, Y. Kiyohara, Y. Akiyama, Identification of melanoma antigens using a Serological Proteome Approach (SERPA), *Cancer Genomics—Proteomics* 7 (2010) 17–23.
  - [36] J.M. Wood, B. Chavan, I. Hafeez, K.U. Schallreuter, Regulation of tyrosinase by tetrahydropteridines and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325 (2004) 1412–1417.
  - [37] L.A.G. Sarosi, M.S. Rieber, M. Rieber, Hydrogen peroxide increases a 55-kDa tyrosinase concomitantly with induction of p53-dependent p21 waf1 expression and a greater Bax/Bcl-2 ratio in pigmented melanoma, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312 (2003) 355–359.
  - [38] J.D. Spencer, N.C.J. Gibbons, H. Rokos, E.M.J. Peters, J.M. Wood, K.U. Schallreuter, Oxidative stress via hydrogen peroxide affects proopiomelanocortin peptides directly in the epidermis of patients with vitiligo, *J. Invest. Dermatol.* 127 (2006) 411–420.
  - [39] J.P. Brown, W. Wei, J.M. Sedivy, Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts, *Science* 277 (1997) 831–834.
  - [40] Q.H. Zheng, L.W. Ma, W.G. Zhu, Z.Y. Zhang, T.J. Tong, p21Waf1/Cip1 plays a critical role in modulating senescence through changes of DNA methylation, *J. Cell Biochem.* 98 (2006) 1230–1248.
  - [41] D. Laporte, A. Lebaudy, A. Sahin, B. Pinson, J. Ceschin, B. Daigian-Fornier, I. Sagot, Metabolic status rather than cell cycle signals control quiescence entry and exit, *J. Cell Biol.* 192 (2011) 949–957.
  - [42] J.Q. Tian, A. Quaroni, Involvement of p21(WAF1/Cip1) and p27(Kip1) in intestinal epithelial cell differentiation, *Am. J. Physiol.—Cell Physiol.* 276 (1999) C1245–C1258.
  - [43] Y.H. Kwon, A. Jovanovic, M.S. Serfas, H. Kiyokawa, A.L. Tyner, p21 Functions to Maintain Quiescence of p27-deficient Hepatocytes, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 41417–41422.
  - [44] L. Neckers, Heat shock protein 90: The cancer chaperone, *J. Biosci.* 32 (2007) 517–530.
  - [45] G.H.E.M. Meyerson, C. L. Wu, L. K. Su, C. Gorka, C. Nelson, E. Harlow, L. H. Tsai, A family of human cdc2-related protein kinases, *Embo. J.* 11 (1992) 2909–2917.
  - [46] K. Braun, G. Holz, T. Soucek, C. Geisen, T. Moroy, M. Hengstschlager, Investigation of the cell cycle regulation of cdk3-

- associated kinase activity and the role of cdk3 in proliferation and transformation, *Oncogene* 17 (1998) 2259–2269.
- [47] S. van den Heuvel, E. Harlow, Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control, *Science* 262 (1993) 2050–2054.
- [48] Y. Liu, J. He, S. Ji, Q. Wang, H. Pu, T. Jiang, L. Meng, X. Yang, J. Ji, Comparative studies of early liver dysfunction in senescence-accelerated mouse using mitochondrial proteomics approaches, *Mol. Cell. Proteomics* 7 (2008) 1737–1747.
- [49] H.R. Christofk, M.G. Vander Heiden, M.H. Harris, A. Ramanathan, R.E. Gerszten, R. Wei, M.D. Fleming, S.L. Schreiber, L.C. Cantley, The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth, *Nature* 452 (2008) 230–233.
- [50] A. Perl, R. Hanczko, T. Telarico, Z. Oaks, S. Landas, Oxidative stress, inflammation and carcinogenesis are controlled through the pentose phosphate pathway by transaldolase, *Trends Mol. Med.* 17 (2011) 395–403.
- [51] S.C. Cedrola Rosanna, Caterina A.M. La Porta, Effect of glucose stress conditions in BL6T murine melanoma cells, *Melanoma Res.* 14 (2004) 345–351.
- [52] N. Wang, D. Stamenovic, Mechanics of vimentin intermediate filaments, *J. Muscle Res. Cell Motil.* 23 (2002) 535–540.
- [53] I. Paron, A. D'Elia, C. D'Ambrosio, A. Scaloni, F. D'Aurizio, A. Prescott, G. Damante, G. Tell, A proteomic approach to identify early molecular targets of oxidative stress in human epithelial lens cells, *Biochem. J.* 378 (2004) 929–937.
- [54] X. Yang, J. Wang, C. Liu, W.E. Grizzle, S. Yu, S. Zhang, S. Barnes, W.J. Koopman, J.D. Mountz, R.P. Kimberly, H.-G. Zhang, Cleavage of p53-vimentin complex enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, *Am. J. Pathol.* 167 (2005) 705–719.
- [55] M.S. Sheikh, A.J. Fornace, Death and decoy receptors and p53-mediated apoptosis, *Leukemia* 14 (2000) 1509–1513.
- [56] J. Cuezva, M. Sánchez-Aragó, S. Sala, A. Blanco-Rivero, Á. Ortega, A message emerging from development: the repression of mitochondrial  $\beta$ -F1-ATPase expression in cancer, *J. Bioenerg. Biomembr.* 39 (2007) 259–265.
- [57] K.G. Chen, J.C. Valencia, J.-P. Gillet, V.J. Hearing, M.M. Gottesman, Involvement of ABC transporters in melanogenesis and the development of multidrug resistance of melanoma, *Pigm. Cell Melanoma Res.* 22 (2009) 740–749.